

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Implicación de TLR4 en la neurorreparación tras ictus isquémico  
experimental**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

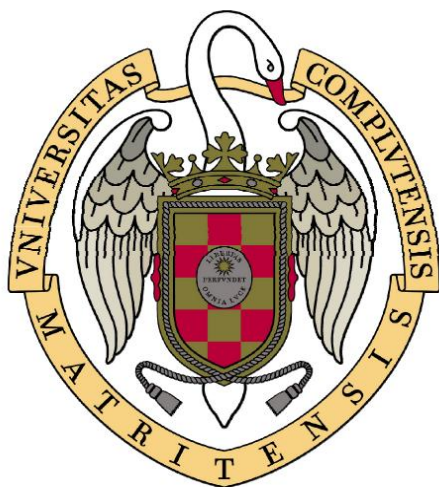
**Ana Moraga Yébenes**

Directores

Ignacio Lizasoain Hernández  
María Ángeles Moro Sánchez  
Jesús Pradillo Justo

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología

**Implicación de TLR4 en la  
neurorreparación tras ictus  
isquémico experimental**

**TESIS DOCTORAL**  
**Ana Moraga Yébenes**

Directores de tesis:  
Ignacio Lizasoain Hernández  
M<sup>a</sup> Ángeles Moro Sánchez  
Jesús Pradillo Justo

**Madrid, 2014**



## **AGRADECIMIENTOS**

Ojalá pudiéramos regalar tiempo y sonrisas a todo el mundo cada día. Ojalá fuera tan fácil pensar siempre con claridad como lo es soñar despiertos. Ojalá todos los días fueran brillantes. Pero no es así. No importa, me quedo con el tiempo que compartimos, con las risas, con mis sueños y con todos los demás días también. Gracias a todos.

Aunque quisiera, es imposible detallar lo que me importáis cada uno de vosotros y cuanto os agradezco haberme acompañado estos años.

Mis primeras palabras de gratitud son de todo corazón para Nacho y María Ángeles, mis mentores, mis amigos. Gracias por la confianza que siempre habéis depositado en mí y por la oportunidad de aprender y formarme en un grupo de investigación tan bueno. Gracias por haberme ayudado desde el primer día hasta el último, en el que escribo estas palabras. Nunca olvidaré el esfuerzo que hicisteis por mí cuando lo necesité, en lo profesional y en lo personal. También quiero agradeceros haberme permitido colaborar con grupos de gran calidad que han hecho mejorar muchísimo mi formación, como el grupo del Dr. Costantino Iadecola, donde trabajé mano a mano con Giuseppe Faraco durante mi estancia en Nueva York, con el equipo del Dr. Manuel Fresno y el siempre atento y servicial Miguel Ángel Llamas, con los Dres. Víctor González y Gerónimo Fernández del hospital Ramón y Cajal, y el Dr. Abraham Martín del centro de investigación CIC biomaGUNE de San Sebastián. De todos ellos siempre he recibido sabiduría y amabilidad.

Por supuesto, este trabajo no sería posible sin la ayuda constante de mi querida UIN. Gracias, uinianos míos, por todo lo que me habéis enseñado, mucho más allá de la ciencia. Os debo tanto. Es increíble mi suerte por haber encontrado amigos como vosotros. Empezando por mis “Tolais”, mis chicas. Ay Martita, qué alegría haberme contagiado con tu entusiasmo por aprender. Has cambiado muchísimo desde que nos conocimos, un salto vertiginoso de madurez personal y profesional. ¡Y ya empiezas tu carrera como neuróloga!



Qué orgullosa estoy de ti. Sara y Ali, gracias por vuestra paciencia y por ser tan buenas conmigo. ¡Formamos un gran equipo! Y hablando de estas cosas, equipo A, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar, mano a mano, Mari y sus chicos, Juan y Alberto, sois geniales, divertidos e inteligentes, vamos, de lo mejorcito. Iván, te echo muuucho de menos, pero sé que estamos cerca. Isaac, mi primo de pega, tu amistad y tus conocimientos en ciencia (y en estadísticas varias...) me han ayudado mucho. Roberto, es una alegría ver siempre tu gesto amable, todos los días. Muchas gracias también a todos mis demás compañeros Maki, Maica, David, Jesús, Oli, Pilar, Víctor y, cómo no, a los nuevos fichajes estudiantes de máster, Frenan, Isa, Diego y Juan, sois aire fresco en nuestro día a día. También recordar a los que ya siguieron su camino: Juan Guillermo Sarruk, Mónica y Tamara. Y gracias Lidia, por hacernos todo más fácil gestionando los recursos tan bien.

Querida Ali, mnp, gracias por llenar mi vida de risa y de positividad. Eres la mejor amiga que se puede tener y pura medicina (de herbolario, claro) contra la tristeza.

Y mi dedicatoria más especial es para Mari, mi amiga, mi maestra en tantas ocasiones. Eres motivación y vitalidad, a tu lado la ciencia es mucho más accesible. Te adoro y te doy las gracias por haberme apoyado siempre, en las duras y en las maduras. Eres una gran persona.

Gracias también a los compañeros de otros grupos que siempre habéis estado ahí cuando he necesitado vuestra ayuda y con los que he pasado muy buenos ratos. También quiero dar las gracias a todo el personal del departamento, del animalario y a los chicos de la cafetería por tratarnos siempre tan bien.

Y, por supuesto, quiero agradecer a mis amigos de la universidad de Granada: Domi, Miguel, Erica y Rocío mis primeros años de contacto con la

ciencia. Recuerdo con muchísimo cariño las largas tardes que compartimos en la pecera o en cualquier otra sala de estudio. Eran geniales, estudiábamos y reíamos a partes iguales. Me acuerdo muchísimo de vosotros y de aquellos maravillosos años.

Muchísimas gracias a mi familia: siempre me habéis apoyado incondicionalmente para perseguir mis sueños, y siempre me habéis tendido una mano, aunque me equivocase. Sobre todo tú, mamá, que me has enseñado que con esfuerzo todo se puede alcanzar. Eres el pilar más fuerte e importante de mi vida. Gracias por darme tanto amor.

Y gracias a ti, Martín, por compartir tu vida conmigo y todos nuestros sueños. Eres mi presente y todo cuanto quiero tener. Gracias por quitarle hierro a mis pequeños y exagerados dramas y por la complicidad del día a día. Gracias por haberte adaptado a mi vida y a mis necesidades. Gracias por hacerme feliz.

Espero no dejar a nadie en el tintero porque habría sido un despiste terrible pero, también le digo, como al resto,

**Muchísimas gracias**



**AIT** – Ataque isquémico transitorio.

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AMPA** – Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

**ARNds** – Ácido ribonucleico de cadena doble.

**ARNi** – Ácido ribonucleico pequeño de interferencia.

**ARNm** – Ácido ribonucleico mensajero.

**ARNss** – Ácido ribonucleico de cadena sencilla

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BDNF** – Factor neurotrófico derivado del cerebro

**BHE** – Barrera Hematoencefálica.

**BrdU** –5-bromo-2-deoxiuridina

**CDP-choline** – Citicolina

**COX-2** – Ciclooxygenasa tipo 2.

**Dcx** – Doblecortina.

**DAMPs** – Patrones moleculares asociadas al daño celular. *Damage-associated molecular patterns*

**DD** – Dominio de muerte. *Death domain*

**E.E.M.** – Error estándar de la media

**ECV** – Enfermedad Cerebrovascular

**EGF** – Factor de crecimiento epidermal

**FGF** – Factor de crecimiento de fibroblastos

**G-CSF** – Factor estimulante de colonias de granulocitos

**HMGB1** – Proteína de grupo de alta movilidad B1

**HSP** – Proteínas de choque térmico.

**Iba-1** – Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*).

**ICAM-1** – Molécula de adhesión intracelular tipo 1.

**IFN-β** – Interferón beta.

**IFN-α** – Interferón gamma.

**IKK** – Quinasa de IB. I kappaB kinase

**IL-1β** – Interleuquina 1 beta.

**IL-6** – Interleuquina 6.

**IRAK** – Kinasa asociada al receptor de IL.

**IRF** – Factor regulador de interferon. Interferon regulator factor

**iNOS** – Sintasa de óxido nítrico inducible.

**Ki67**

**IntDen** – Densidad Integrada.

**LPS** – Lipopolisacárido

**LRR** – Dominio rico en leucina. Leucin rich domain

**LFA** – Integrina β2 de leucocitos

**Mac-1** – Integrina β2 de leucocitos

**MAPK** – Proteína quinasa activada por mitógeno.

**MCAO** – Oclusión de la arteria cerebral media.

**MCP-1** – Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1.

**MMPs** – Metaloproteinasas de matriz

**MyD88** – Factor de diferenciación mieloide 88. *Myeloid differentiation factor 88*

**NeuN** – Núcleo de neuronas. Neuronal nuclei

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**NO** – Óxido nítrico.

**NOS** – Óxido nítrico sintasa. *Nitric oxide sintase*

**OMS** – Organización Mundial de la Salud.

**PAMPs** – Patrones moleculares asociados a patógenos. (del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*)

**PBR** – Receptor de benzidiazepina periférica

**PBS** – Tampón fosfato salino. Phosphate buffer saline

**PCI** - Precondicionamiento isquémico

**pH3 (fosfohistona)**

**pMCAO** – Oclusión permanente de la arteria cerebral media.

**PMN** – Células polimorfonucleares

**PRR** – receptores de reconocimiento de patrones. *Pattern Recognition Receptors*

**r-tPA** – Activador del plasminógeno tisular recombinante (Alteplase).

**RANTES** – Quimioquina RANTES.

**RMN** – Resonancia magnética nuclear.

**RMS** – Ruta migratoria rostral

**SCID** – Inmunodeficiencia grave combinada.

**SGZ** – Zona subgranular.

**SIID** – Síndrome de inmunodepresión post-ictus

**siRNA** – ARN de interferencia pequeño

**SIRS** – Síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica

**SNC** – Sistema nervioso central.

**STAIR** – (*stroke treatment academic industry roundtable*)

**TGF-β** - Factor de crecimiento transformante beta.

**TIR** – Dominio del receptor Toll/IL. Toll/IL receptor domain

**TIRAP** – Proteína asociada al receptor Toll/IL. Toll/IL receptor-associated protein

**TK-1** – Timidina Kinasa 1

**TLR** – Receptor toll-like.

**TNF-α** – Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

**TRADD** – Dominio de muerte asociado al receptor de TNF-. *TNF-receptor associated death domain*.

**TRAF** – Factor asociado al receptor de TNF. *TNFR associated factor*

**TRAM** – Molécula adaptadora relacionada con TRIF. *TRIF-related adaptor molecule*

**TRIF** – Factor activador de interferon asociado al receptor Toll. *TIR associated domain and IFN inducer*

**VEGF** – Factor de crecimiento de endotelio vascular.

**ZSG** – Zona subgranular

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Definición .....	7
1.1.2. Clasificación.....	7
1.1.3. Epidemiología .....	8
1.1.4. Tratamiento.....	9
1.1.4.1. Tratamiento no farmacológico .....	9
1.1.4.2. Tratamiento farmacológico .....	9
<b>1.2. ICTUS ISQUÉMICO .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Unidad cerebrovascular .....	10
1.2.2. Conceptos de core y penumbra .....	11
1.2.3. La cascada isquémica .....	13
1.2.4. Mecanismos isquémicos locales (Inflamación) .....	14
1.2.4.1. Inflamación vascular y perivascular .....	16
1.2.4.2. Inflamación tisular .....	17
1.2.4.3. Resolución de la inflamación y reparación del tejido.....	18
<b>1.3. INMUNIDAD E ICTUS .....</b>	<b>19</b>
1.3.1. Sistema nervioso central y regulación de la respuesta inmune .....	19
1.3.1.1. Respuesta inmune e inmunodepresión.....	19
1.3.1.2. Respuestas local y periférica .....	20
1.3.1.3. Infiltración celular .....	21
1.3.2. La inmunidad innata en la isquemia cerebral: receptores toll-like....	24
1.3.2.1. Receptores toll-like (TLRs): origen, estructura y ligandos .....	24
1.3.2.2. Rutas de señalización de los TLRs.....	28
1.3.2.3. Funciones fisiológicas de los TLRs.....	30
1.3.2.4. Funciones patológicas de los TLRs .....	31
1.3.3. La inmunidad adquirida en la isquemia cerebral.....	33
<b>1.4. NEUROGÉNESIS E ICTUS .....</b>	<b>34</b>
1.4.1. Neurogénesis adulta .....	34
1.4.1.1. Etapas de la neurogénesis .....	35
1.4.1.2. Modelo de neurogénesis adulta de Kempermann.....	37
1.4.2. Neurogénesis adulta e ictus.....	39

1.4.2.1. Migración de neuroblastos desde la ZSV tras ictus .....	39
1.4.2.2. Diferenciación e integración de neuronas maduras tras ictus .....	40
<b>1.5. FACTORES QUE MODIFICAN LA NEUROGÉNESIS .....</b>	<b>41</b>
1.5.1. Respuesta inmune (TLR4) .....	41
1.5.2. Envejecimiento.....	42
1.5.2.1. Envejecimiento e ictus .....	42
1.5.2.2. Envejecimiento e inflamación .....	43
1.5.2.3. Envejecimiento y neurogénesis .....	44
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	49
2.2. HIPÓTESIS .....	50
2.3. OBJETIVOS.....	50
2.2.1. Estudio de la implicación del receptor TLR4 como mediador de daño en la fase aguda y de neuroreparación en la fase crónica. ....	50
2.2.2. Estudio de la influencia de la edad .....	50
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.1. DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	53
3.1.1. Animales .....	53
3.1.2. Modelo experimental. Inducción de isquemia focal permanente .....	53
3.1.3. Grupos experimentales .....	54
3.1.4. Diseño experimental y protocolo de inyecciones de BrdU .....	54
3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	55
3.2.1. Preparación de muestras común para todos los ensayos de inmunofluorescencia .....	55
3.2.2. Preparación de suspensiones de células de corteza del peri-infarto para citometría de flujo .....	55
3.2.3. Preparación de suspensiones de células de la zona subventricular (SVZ) para citometría de flujo .....	56
3.2.4. Extracción de sangre y preparación de muestra para citometría .....	57
3.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....	58
3.3.1. Evaluación del daño isquémico .....	58
Determinación del volumen de infarto por resonancia magnética.....	58
Determinación del volumen de infarto por tinción de Nissl .....	59
3.3.2. Inmunofluorescencia .....	60
3.3.3. Análisis por citometría de flujo .....	64

3.3.4. Estudio por neuroimagen de inflamación y proliferación.....	67
<b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>68</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Estudio del efecto del receptor TLR4 en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental .....</b>	<b>71</b>
4.1.1. Efecto de TLR4 en el tamaño del infarto cerebral.....	71
4.1.2. Efecto de TLR4 en la proliferación celular .....	73
a. Influencia del tamaño del infarto en la proliferación celular.....	73
b. Proliferación celular en la zona subventricular.....	74
4.1.3. Efecto de TLR4 en la migración de neuroblastos hacia la zona isquémica.....	78
4.1.4. Efecto de TLR4 en la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto.....	79
<b>4.2. Estudio del efecto del receptor TLR4 en parámetros inflamatorios tras ictus isquémico experimental .....</b>	<b>81</b>
4.2.1. Efecto de TLR4 en la proliferación microglial.....	81
- En la corteza peri-infarto .....	81
- En el cuerpo calloso.....	83
4.2.2. Efecto de TLR4 en la infiltración celular.....	84
4.2.3. Efecto de TLR4 en la respuesta circulante periférica.....	86
<b>4.3. Estudio del efecto de la edad en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental .....</b>	<b>88</b>
4.3.1 Efecto de la edad en el tamaño del infarto cerebral.....	88
4.3.2. Efecto de la edad en la proliferación celular .....	89
a. Influencia del tamaño del infarto en la proliferación celular en la ZSV .....	89
4.3.3. Efecto de la edad en la migración de neuroblastos hacia la zona isquémica.....	91
4.3.4. Efecto de la edad en la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto.....	92
<b>4.4. Estudio del efecto de la edad en parámetros inflamatorios tras ictus isquémico experimental .....</b>	<b>94</b>
4.4.1. Efecto de la edad en la proliferación microglial.....	94
4.4.2. Efecto de la edad en la infiltración celular.....	95
4.4.3. Efecto de la edad en la respuesta circulante periférica.....	97
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>



<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>7. RESUMEN .....</b>	<b>123</b>
<b>8. SUMMARY .....</b>	<b>135</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>

# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

#### 1.1.1. Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define **ictus o enfermedad cerebrovascular** como "la aparición súbita de trastornos de la función cerebral, con síntomas que duran más de 24 horas, o que llevan a la muerte, sin otra causa aparente que un origen vascular". Un ictus ocurre cuando se produce la disminución brusca del aporte sanguíneo a un área concreta del cerebro, ya sea por la presencia de un coágulo (ictus isquémico), o por la ruptura de un vaso sanguíneo y la consecuente extravasación sanguínea (ictus hemorrágico). Los síntomas que se manifiestan variarán según el área irrigada por el vaso afectado, pudiendo revertirse total o parcialmente si se recupera el flujo de forma temprana. En caso contrario, la interrupción permanente del aporte sanguíneo desencadena una serie de eventos bioquímicos, conocidos como **cascada isquémica**, que llevan a la muerte celular y a la aparición de una zona infartada.

#### 1.1.2. Clasificación

Existen varias clasificaciones basadas en la etiología, aunque muy semejantes entre ellas (Chen et al., 2012a). Lo que varía entre una y otra es la evolución de las técnicas usadas para el diagnóstico, lo que ha llevado a modificar levemente los criterios de clasificación, siendo la más conocida la clasificación TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment). En la cual se distinguen: ictus isquémico (supone el 88% de los casos) e ictus hemorrágico (12%) (Figura 1.1.). Dentro del ictus isquémico se diferencian los siguientes grupos: aterotrombótico (15-20%), cardioembólico (20-25%), lacunar (25%), de causa indeterminada (25-30%) y de causa poco frecuente (5%) (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Bejot et al., 2008; Chen et al., 2012a).

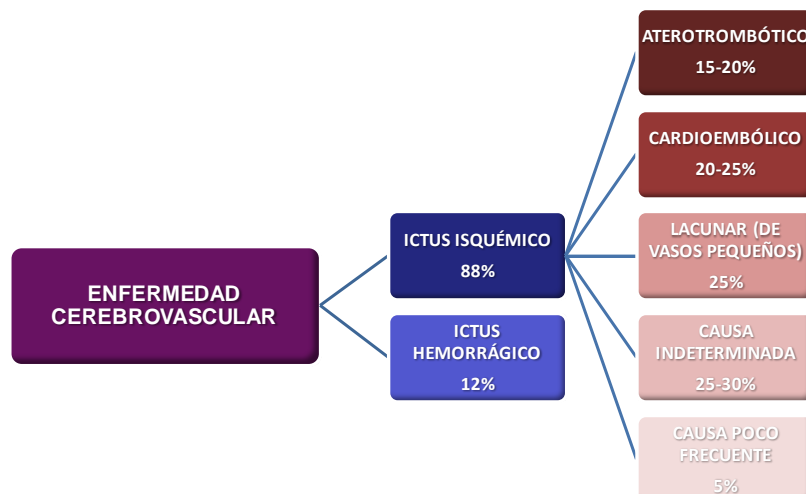


Figura 1.1: Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (Chen et al., 2012).

### 1.1.3. Epidemiología

En el mundo, unos 15 millones de personas sufren un ictus cada año y, con 5 millones de muertes, el ictus es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad a largo plazo (Macrez et al., 2011). Se estima que alrededor del 25% de la población mayor de 85 años desarrollará un ictus.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística (2012), en nuestro país, la enfermedad cerebrovascular es la primera causa de muerte en mujeres, ocupando el segundo lugar como causa de mortalidad en la sociedad española (Tabla 1) y consumiendo un 3-4% del gasto total sanitario.

Año 2012	Total	Hombres	Mujeres
<b>Total defunciones</b>	<b>402.950</b>	<b>205.920</b>	<b>197.030</b>
Enfermedades isquémicas del corazón	34.751	19.973	14.778
Enfermedades cerebrovasculares	29.520	12.436	17.084
Cáncer de bronquios y pulmón	21.487	17.661	3.826
Insuficiencia cardíaca	18.453	6.412	12.041
Enf. crónicas de las vías respiratorias inferiores (ECVRI)	16.964	12.557	4.407
Demencia	16.361	5.314	11.047
Enfermedad de Alzheimer	13.015	3.830	9.185
Cáncer de colon	11.768	6.937	4.831
Enfermedad hipertensiva	10.273	3.354	6.919
Diabetes mellitus	9.987	4.207	5.780
Neumonía	9.289	4.699	4.590
Insuficiencia renal	7.067	3.282	3.785
Cáncer de mama	6.375	93	6.282
Cáncer de próstata	6.045	6.045	-
Cáncer de páncreas	5.976	3.121	2.855

(1) Causas con peso relativo superior al 1,5%

Tabla 1: Número de defunciones según las causas de muerte más frecuentes.

#### 1.1.4. Tratamiento

En los últimos 15 años se ha llevado a cabo un gran progreso en el tratamiento en fase aguda del ictus isquémico.

##### 1.1.4.1. Tratamiento no farmacológico

Se han desarrollado unidades especializadas en el manejo del ictus con protocolos unificados de tratamiento y con un riguroso control de las medidas generales. Son las llamadas “**unidades de ictus**” (Hanger et al., 2007). Estas unidades se han creado acompañadas del llamado “código ictus” que se refiere a la actuación coordinada de los servicios de urgencias extrahospitalarios con las unidades de ictus de los centros hospitalarios para atender al paciente de forma rápida y adecuada, monitorizándolo y llevándolo hasta una unidad de ictus a la que podrá llegar con un diagnóstico y control precisos.

##### 1.1.4.2. Tratamiento farmacológico

También se ha llevado a cabo una gran inversión en investigación en la búsqueda de un agente neuroprotector efectivo que trate de limitar el daño isquémico al prevenir la muerte de las neuronas que rodean al núcleo del infarto, disminuyendo así la lesión. (Auriel and Bornstein, 2010). Se han identificado más de 1000 moléculas con efectos protectores para el cerebro a partir de modelos experimentales y más de 250 han llegado a ensayos clínicos (Young et al., 2007). Pero, a pesar de estos esfuerzos, la traslación de terapias efectivas a nivel experimental ha fracasado en la clínica (Cheng et al., 2004; Ginsberg, 2009). Hasta la fecha, el único tratamiento aprobado es la recanalización del vaso ocluido por medio de la administración intravenosa de alteplasa o rt-PA (Activador del Plasminógeno Tisular Recombinante) (1995), con el inconveniente de que es una terapia dependiente del tiempo, ya que tiene que ser aplicada dentro de las 4,5 horas después del comienzo del ictus. Además, el efecto beneficioso del tPA está limitado a una pequeña proporción de pacientes de ictus (Albers et al., 2011). Por tanto es muy importante y necesario encontrar otras terapias eficaces que puedan ser administradas alrededor de esa ventana temporal (Moskowitz et al., 2010). El fracaso en la traslación, más que a la poca eficacia de las terapias neuroprotectoras en el humano, podría deberse a diversas causas señaladas por la convención STAIR (Stroke Treatment Academic Industry Roundtable), como lo adecuados que

puedan ser los modelos experimentales de isquemia cerebral, el uso de animales jóvenes y sanos, las ventanas terapéuticas ensayadas o la heterogeneidad de los ictus en pacientes ((STAIR), 1999; Moskowitz et al., 2013)

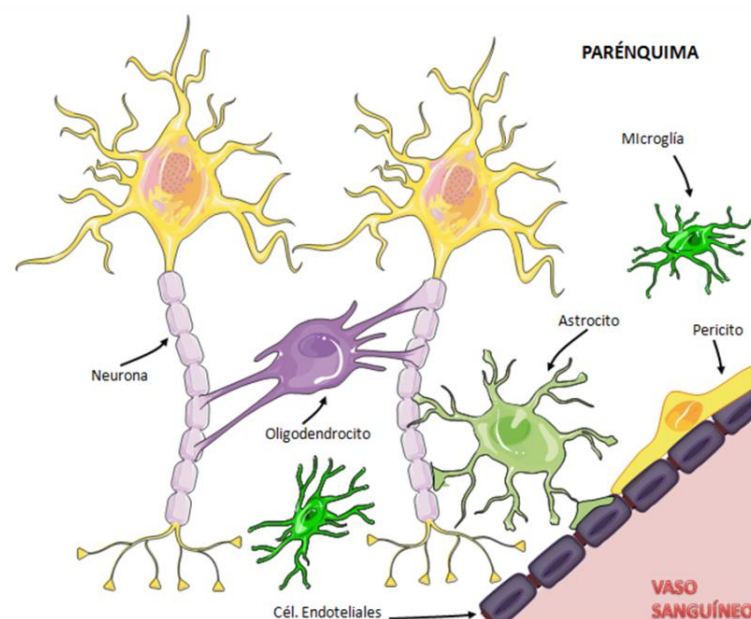
## **1.2. ICTUS ISQUÉMICO**

### **1.2.1. Unidad cerebrovascular**

El papel fundamental que los vasos sanguíneos cerebrales juegan en el amplio espectro de enfermedades de afectación neurovascular muestra la importancia de la estructura vascular y su función en el cerebro sano. Debido a su alta necesidad energética y a la escasa reserva de ATP, el cerebro requiere un aporte sanguíneo continuo y bien regulado. La mayoría de la energía la usan las neuronas para “recargar” las bombas iónicas y así mantener y restaurar los gradientes iónicos disipados por la actividad sináptica. El cerebro recibe ese suplemento de las arterias que surgen del círculo de Willis, un polígono de vasos interconectados en la base del cerebro formado por las anastomosis entre dos arterias carótidas internas y dos arterias vertebrales que confluyen en la arteria basilar.

Como en otros órganos, las células endoteliales regulan el tono vascular liberando factores vasoactivos en respuesta a señales químicas, neurotransmisores, fuerza mecánica, etc. Pero, a diferencia de otros órganos, las células endoteliales cerebrales están unidas entre sí por complejas uniones formadas por ocludinas y claudinas (uniones estrechas) que le otorgan una baja permeabilidad selectiva previniendo el intercambio bidireccional de sustancias hidrofílicas entre la sangre y el cerebro, una característica fundamental de la barrera hematoencefálica (BHE). Las células de la unidad neurovascular también participan en el buen funcionamiento de la BHE y en la iniciación y expresión de respuestas inmunes innatas y adaptativas del cerebro (Figura 1.2). Los pericitos y macrófagos perivasculares tienen el potencial para presentar antígenos, el primer paso de la inmunidad adaptativa; mientras que las células endoteliales y la microglía están ampliamente dotadas de receptores de inmunidad innata como los receptores toll-like, CD36 y RAGE (Iadecola, 2013).





**Figura 1.2. La unidad neurovascular.** Representación de la distribución de las células que componen la unidad neurovascular en el parénquima cerebral sano. Las células endoteliales son la base de la barrera hematoencefálica (BHE) que impide la extravasación de la mayoría de componentes del plasma sanguíneo al parénquima.

La oclusión de los vasos cerebrales causa la disminución de oxígeno y glucosa que desencadena cascadas isquémicas que conducen a la muerte celular necrótica y, posteriormente, apoptótica en el área del infarto.

Más adelante, en este apartado, repasaremos con detenimiento los eventos más importantes que suceden tras la isquemia.

### 1.2.2. Conceptos de core y penumbra

Tras una isquemia cerebral focal, dependiendo de la irrigación por vasos colaterales, podemos definir **core** o núcleo isquémico al territorio donde se produce un mayor grado de isquemia porque estaba irrigado exclusivamente por el vaso obstruido (10% del flujo basal). En esta área las neuronas morirán por necrosis rápidamente (de 5 a 10 minutos tras la interrupción del flujo sanguíneo) ya que éstas tienen un alto índice metabólico y están condicionadas por el metabolismo oxidativo. Así, cuando el aporte de oxígeno se reduce bruscamente, las células sufren rápidamente estrés metabólico. Rodeando esta zona de infarto existe otra, denominada **penumbra** isquémica, en donde el flujo sanguíneo se ve reducido parcialmente al quedar irrigada por vasos colaterales. La perfusión remanente, entre un 10-30% del basal, es suficiente para mantener la viabilidad celular por un tiempo determinado, que



dependerá del grado de hipoperfusión, pero no para permitir su función normal (Astrup et al., 1981). Esta área de penumbra es susceptible de recuperación si se restaura el flujo sanguíneo y se corrigen las alteraciones bioquímicas producidas como consecuencia de la isquemia. Si no es así, también se desencadenará la muerte celular, pero normalmente por apoptosis, que puede darse tanto a través de la ruta intrínseca como a través de la extrínseca. La ruta intrínseca se activa cuando las neuronas no son capaces de mantener el balance iónico que causa una pérdida de potencial de membrana, y éste, a su vez, lleva a un flujo de calcio que causa la desorganización de la mitocondria, lo que provoca la apertura de la membrana, liberándose citocromo C y permite al apoptosoma formarse y causar la apoptosis de la célula a través de las acciones de las caspasas 3 y 9 (Guan et al., 2006). La ruta extrínseca está mediada por la activación de los receptores de la superfamilia de receptores TNF, que inician la cascada de caspasas más directamente. Se ha visto que inhibiendo cualquiera de estas dos rutas se reduce el volumen de infarto.

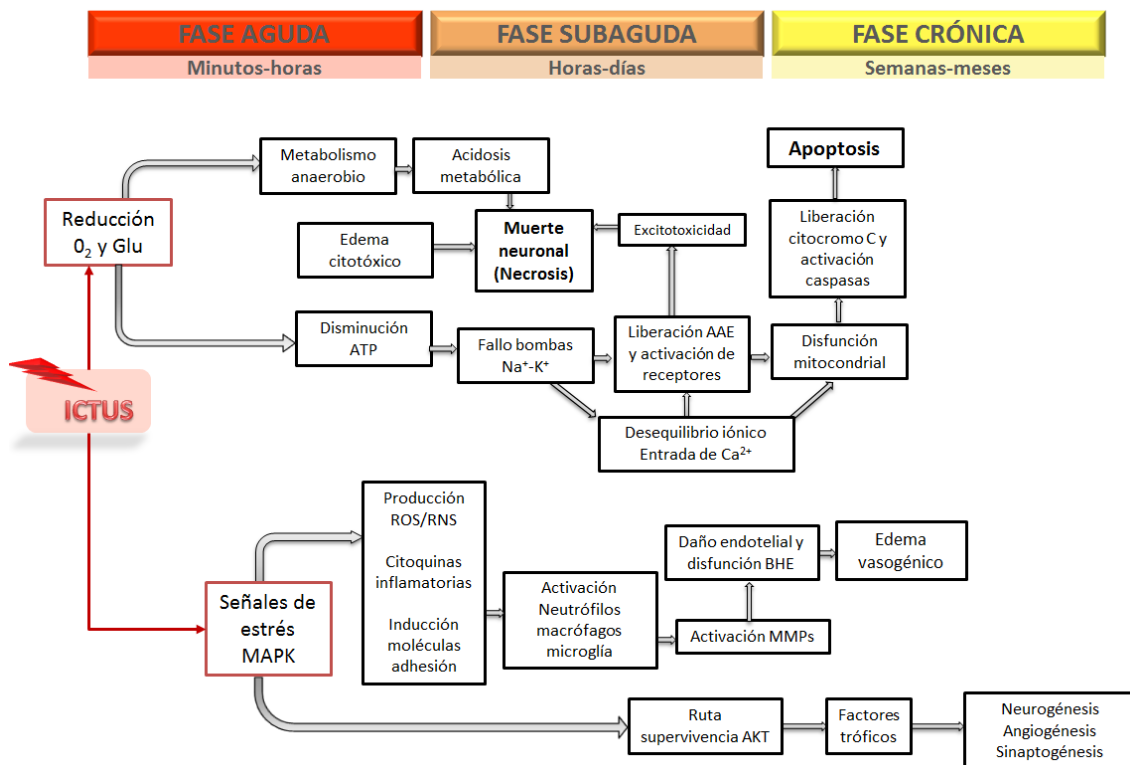
Finalmente, queda una zona oligohémica que rodea a la penumbra, que tiene un flujo sanguíneo claramente mayor (entre un 30-50% del basal), pero que no llega a comprometer la viabilidad y hasta donde la muerte celular no progresará, salvo en circunstancias especialmente adversas (Hossmann, 1994; Baron, 2001).

Sin embargo, la distinción entre core y penumbra no está totalmente consensuada. Muchos ictus ocurren por estenosis parcial, por lo que la reducción del flujo sanguíneo puede no ser total y, por lo tanto, carecerían de core según la definición anterior. Además, la isquemia afecta a todos los tipos celulares de la unidad neurovascular y, debido a que no son igual de susceptibles, tanto apoptosis como necrosis, e incluso formas intermedias de muerte, ocurren de manera simultánea en el tejido isquémico. Por ello, a efectos prácticos, se considera core como aquel territorio insalvable en donde ya se está produciendo la muerte celular y como penumbra el área susceptible de ser salvada (Fisher and Albers, 2013).

### 1.2.3. La cascada isquémica

La cascada isquémica cerebral se compone por el conjunto de reacciones bioquímicas que se inician en el cerebro tras un episodio isquémico y que se prolongan en el tiempo pudiendo extenderse a semanas o meses (Figura 1.3.). Se caracteriza por una serie de eventos que en última instancia darán lugar a la muerte neuronal y, por tanto, a la destrucción del tejido.

Las principales consecuencias de la isquemia cerebral se generan fundamentalmente por un problema energético. En un área de aporte de sangre reducido, el consumo de adenosín trifosfato (ATP) continúa a pesar de que la síntesis sea insuficiente, causando que los niveles totales de ATP caigan y se desarrolle acidosis láctica con pérdida concomitante de la homeostasis iónica en las neuronas. La isquemia cerebral conduce a una pérdida de la reserva energética que resulta en un desequilibrio iónico y la liberación excesiva de neurotransmisores e inhibición de la recaptación de las neuronas dañadas. A este proceso, que lleva a la destrucción neuronal por necrosis, se le denomina excitotoxicidad y ocurre especialmente con el glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador. El glutamato se acumula en el espacio extracelular y produce la sobreestimulación de receptores ionotrópicos AMPA y NMDA sobre otras neuronas, que promueven un mayor flujo de calcio a través de los canales que se abren por estos receptores (Dirnagl et al., 1999). Estas neuronas se despolarizan provocando mayor flujo de calcio y más liberación de glutamato. Además, la sobrecarga de calcio provoca la activación de fosfolipasas y de proteasas como la calpaína que degradan membranas y proteínas (Lipton, 1999). Por otro lado, los receptores de glutamato promueven un exceso de flujo de sodio y de agua que provoca que se hinchen las células, se produzca edema y, en consecuencia, se reduzca el espacio extracelular. La liberación del glutamato produce disfunción mitocondrial y producción de radicales de oxígeno que, en última instancia, dará lugar a liberación de citocromo C, activación de caspasas y, finalmente, muerte por apoptosis (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Cascada isquémica.** Los eventos que suceden tras el ictus podemos dividirlos en tres fases en función del tiempo transcurrido (Adaptado de (Yenari and Han, 2012)) Abreviaturas: ROS (Especies reactivas de oxígeno) RNS (Especies reactivas de nitrógeno), MMPs (Metaloproteinasas de matriz), AAE (aminoácidos excitadores); BHE (barrera hematoencefálica).

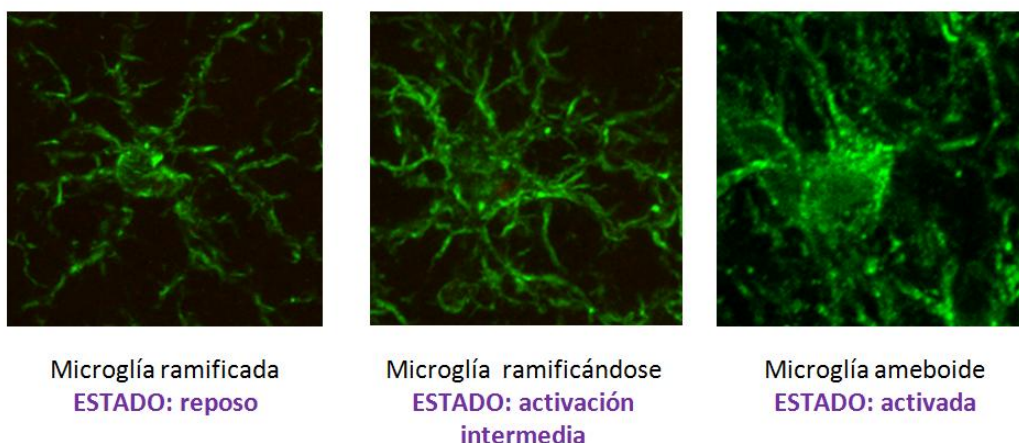
Además de las consecuencias provocadas por la falta de oxígeno y glucosa, tras el ictus se producen señales de estrés que activarán rutas de supervivencia como la de AKT, donde se producen factores tróficos que permitirán la neurogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis, aunque esas mismas señales de estrés también participan en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) en exceso, que determinan “estrés oxidativo” ya que las defensas antioxidantes endógenas son insuficientes. Por último, estas señales de estrés producen mayor liberación de citoquinas proinflamatorias que activarán proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), que dañarán el endotelio con la formación del edema vasogénico (Figura 1.3).

#### 1.2.4. Mecanismos isquémicos locales (Inflamación)

La inflamación es una respuesta protectora del organismo para asegurar la eliminación de estímulos perjudiciales, así como el proceso de curación para recuperar el tejido dañado. La inflamación forma parte de la respuesta

inmunológica innata que está causada por varios factores como infecciones microbianas o daño tisular. Clásicamente la inflamación está caracterizada por 5 síntomas: rubor, tumor, calor, dolor y pérdida de función tisular. Estos síntomas macroscópicos reflejan un incremento en la permeabilidad del endotelio vascular facilitando la pérdida de componentes del suero y la extravasación de células inmunes.

La microglía, que es la principal responsable de la inflamación en el cerebro, al igual que los macrófagos y otras células infiltradas, tiene un repertorio de respuestas que facilitan el rápido secuestro y muerte de los microorganismos invasores y limita el efecto del trauma y de la necrosis celular. Estas respuestas incluyen una migración rápida, proliferación, formación y liberación de superóxido, óxido nítrico, proteasas y citoquinas. La microglía normalmente presenta una morfología ramificada pero, cuando se activa, adquiere una morfología ameboide y expresa marcadores de superficie que la hacen virtualmente indistinguible de los macrófagos y monocitos de la circulación (Figura 1.4). La activación microglial es el primer paso en la respuesta inflamatoria del SNC (Yenari et al., 2010; Karperien et al., 2013).

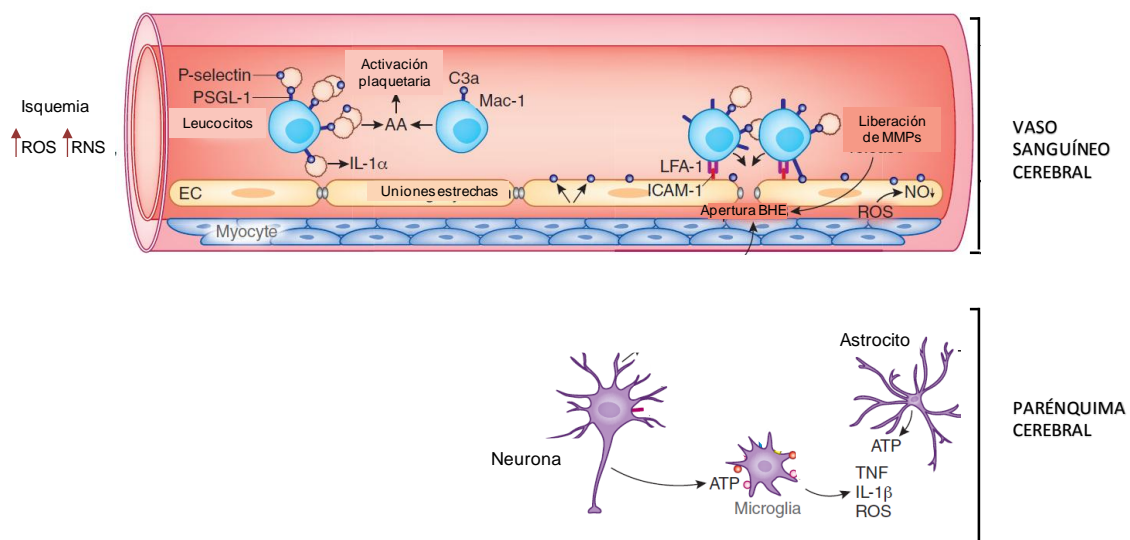


**Figura 1.4. Estados de activación de la microglía.** Se diferencian tres estados de activación con claras diferencias morfológicas. En estado de reposo, la microglía presenta una morfología muy ramificada y un soma pequeño. En el estado intermedio el soma está hipertrofiado y las ramificaciones son más gruesas. Y en el estado de mayor activación, la microglía adquiere un aspecto ameboide y capacidad fagocítica, migratoria y de presentación de antígenos.

En el caso concreto de la isquemia cerebral, la respuesta inflamatoria se caracteriza por el establecimiento de una secuencia de eventos que implican al cerebro, su vasculatura, la sangre y los órganos linfoides.

#### 1.2.4.1. Inflamación vascular y perivascular

Cuando ocurre una isquemia cerebral, de minutos a horas después del comienzo, se produce una cascada de eventos inflamatorios que se inicia en la **microvasculatura cerebral**, donde el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno inducen la activación del sistema del complemento, las plaquetas y las células endoteliales (Iadecola and Anrather, 2011) (Figura 1.5.). Se induce la sobreexpresión de selectinas endoteliales que favorecerá que los leucocitos circulantes sean reclutados a la pared endotelial y se promuevan los eventos de inflamación local (Macrez et al., 2011). En el endotelio activado se produce la degradación de componentes de la matriz de la lámina basal y la barrera hematoencefálica (BHE) perdiendo parcialmente la permeabilidad selectiva mediada por metaloproteinasas de matriz (MMPs), y esto, sumado a un incremento en la secreción de proteasas de origen leucocitario y a la regulación a la baja de la expresión de las proteínas endoteliales de las uniones estrechas que sellan la unidad neurovascular, favorecerá la extravasación de leucocitos circulantes al parénquima cerebral (del Zoppo, 2006).



**Figura 1.5. Mecanismos isquémicos tempranos y locales.** En el lumen de los vasos sanguíneos, los distintos mecanismos que acontecen dan lugar a la apertura de la barrera hematoencefálica (BHE), que permite la extravasación de células y otros componentes del plasma al parénquima cerebral, lo que activará las células residentes provocando el proceso inflamatorio (modificado de (Iadecola and Anrather, 2011)).

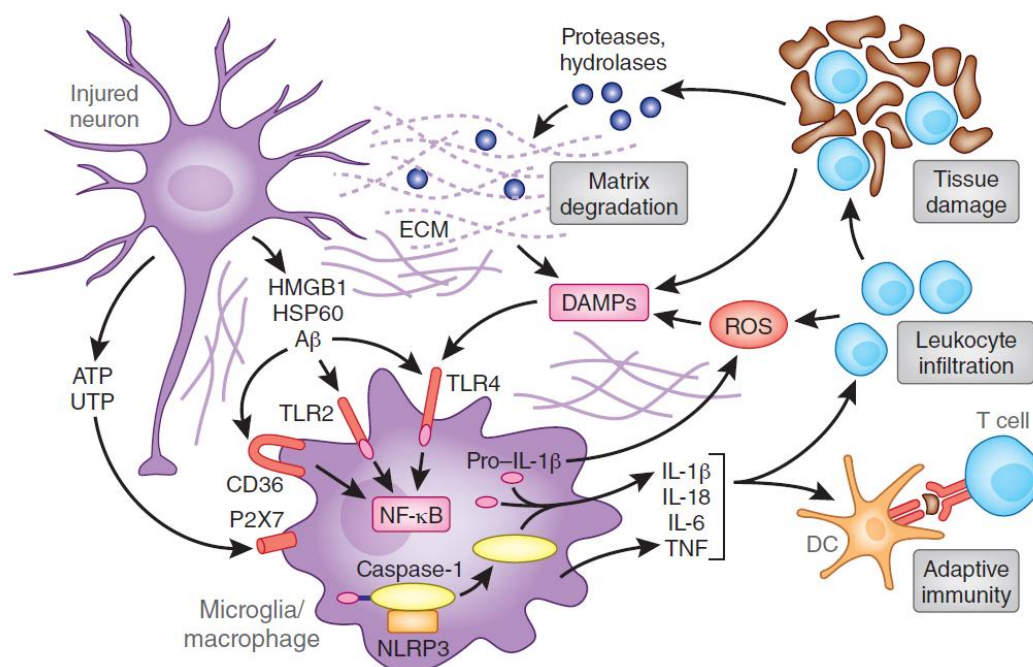
Por otro lado, los mediadores inflamatorios secretados por las células activadas del parénquima amplifican y refuerzan la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que dirigen la infiltración de esas células

inmunes circulantes al cerebro isquémico (Iadecola and Anrather, 2011). Las células que se activan en el parénquima son la microglía, los macrófagos perivasculares, los astrocitos y las células endoteliales, que producen IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Tuttolomondo et al., 2008). El estrés oxidativo en las células endoteliales reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO). Esa pérdida de óxido nítrico promueve vasoconstricción y mayor agregación plaquetaria y leucocitaria.

Por otro lado, en el parénquima cerebral, las células dañadas liberan purinas (ATP), las cuales actúan como señales proinflamatorias que harán que la microglía, los macrófagos perivasculares y los astrocitos produzcan más citoquinas y quimioquinas (Figura 1.5).

#### 1.2.4.2. Inflamación tisular

Cuando progresa la cascada isquémica, la muerte celular conduce a una nueva fase de la respuesta inflamatoria. Las células muertas y las que están muriendo liberan “señales de peligro” que activan el sistema inmune (Figura 1.6).



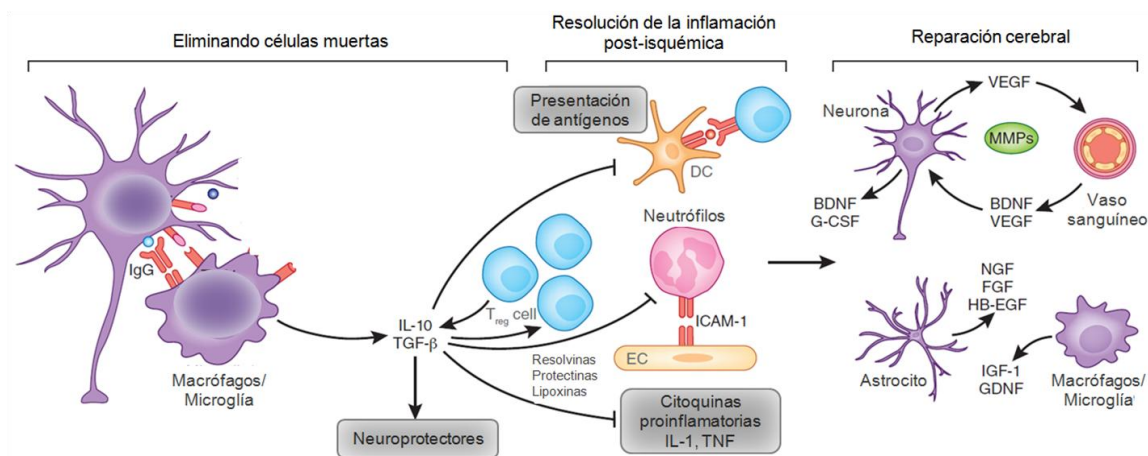
**Figura 1.6. Mecanismos de activación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y de la inmunidad adaptativa.** La muerte celular conduce a la formación de DAMPs, los cuales activan a los receptores toll-like (TLRs) que llevan a la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Pero también activan a células presentadoras de antígenos que establecen las bases de la inmunidad adaptativa (ver texto para más detalle). Modificado de (Iadecola and Anrather, 2011)

Estas moléculas que alertan sobre el peligro al organismo se denominan DAMPs (que serán descritas con más detalle en el siguiente apartado “Receptores Toll-like. Origen y estructura”), que activan a los receptores toll-like (TLRs), especialmente TLR2 y TLR4 sobre la membrana de la microglía. Estos DAMPs incluyen proteínas del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1), proteínas del choque térmico 60 (HSP60) y  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), entre otros. Los DAMPs también son liberados por la ruptura de la matriz. La producción de citoquinas y activación del complemento resultantes de estos eventos conducen a una mayor infiltración leucocitaria y daño tisular, los cuales, a su vez, producen más DAMPs. Finalmente, los antígenos producidos por el daño tisular son presentados a las células T, que establecen la base para la inmunidad adaptativa (Figura 1.6).

#### **1.2.4.3. Resolución de la inflamación y reparación del tejido**

La eliminación de células muertas y la supresión de la inflamación son eventos claves para la reparación cerebral. La fagocitosis promueve la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  que, a su vez, suprimen la presentación de antígenos, promueven la formación de  $T_{reg}$ , inhiben la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, IL-10 y TGF- $\beta$  son también neuroprotectores y podrían facilitar los procesos de reparación cerebral. Además, las lipoxinas, resolvinas y protectinas juegan un papel muy activo en la resolución de la inflamación. Los factores de crecimiento (VEGF, BDNF, NGF, FGF...) y las MMPs que producen las células endoteliales, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía son moléculas fundamentales también para reorganizar el tejido y repararlo (Figura 1.7).





**Figura 1.7. Resolución de la inflamación y reparación del tejido.** Las células fagocíticas eliminan los restos de células muertas, la inflamación se resuelve gracias a citoquinas anti-inflamatorias, lipoxinas y resolvinas. Y se repara el tejido gracias a las metaloproteinasas y a la producción de factores de crecimiento que ayudan a reorganizar el tejido. Modificado de (Iadecola and Anrather, 2011)

### 1.3. INMUNIDAD E ICTUS

#### 1.3.1. Sistema nervioso central y regulación de la respuesta inmune

##### 1.3.1.1. Respuesta inmune e inmunodepresión

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del huésped contra la infección de patógenos y el daño tisular.

En personas con ictus isquémico, el conteo de células sanguíneas blancas y la expresión de citoquinas y de marcadores inflamatorios aumentan en las horas siguientes a la isquemia (o durante el episodio isquémico) (Emsley et al., 2003; Offner et al., 2006). Además, tras el inicio de la respuesta pro-inflamatoria en la fase aguda, al cerebro isquémico le acompaña el síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que resulta en la activación general del sistema inmune.

Sin embargo, el ictus también interfiere con la función de las células inmunes innatas y adaptativas, que resulta en el síndrome de inmunodepresión sistémica (SIID). Si bien este fenómeno parece proteger al cerebro del daño inflamatorio, tiene una importante contrapartida al hacer a los pacientes más susceptibles a infecciones que ponen en riesgo la vida (Meisel et al., 2005; Chamorro et al., 2007; Esmaili et al., 2012). Esta inmunodepresión sistémica será mayor cuanto mayor sea el infarto y se caracteriza por: *i)* la aparición de linfopenia debida a la pérdida masiva apoptótica de linfocitos en órganos linfoides y sangre periférica, y la actividad de células asesinas naturales (NK)



(Członkowska et al., 1979; Meisel et al., 2005); *ii*) una reducción en la actividad funcional de los monocitos; *iii*) sobreexpresión de citoquinas anti-inflamatorias y *iv*) atrofia esplénica (Ren et al., 2011; Haeusler et al., 2012).

La aparente paradoja de que el mismo daño causa inmunodepresión e inflamación en los órganos se explica por la amplia variedad de consecuencias que tiene la activación del SNC. De hecho, durante el daño cerebral se induce tanto la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Catania et al., 2009) como de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) por monocitos sanguíneos. Los estudios experimentales y clínicos indican que, en estas circunstancias, la IL-10 contribuye a reducir la función del sistema inmune (Woiciechowsky et al., 1998).

#### **1.3.1.2. Respuestas local y periférica**

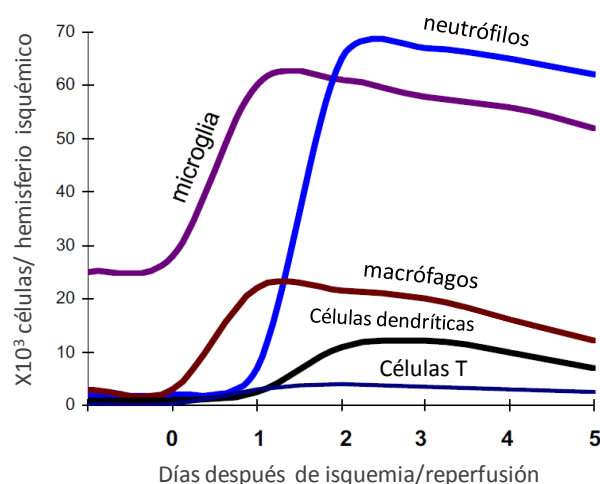
La comunicación entre los sistemas inmune y nervioso se produce de forma local/central y periférica. Localmente, en el SNC, la respuesta inmune induce la activación de las células gliales y de los macrófagos residentes y la infiltración dependiente del tiempo de las células inmunes circulantes.

Muchas de las respuestas inducidas en esta interrelación entre los dos sistemas se basan en las citoquinas secretadas por las células inmunes para comunicarse entre sí. Curiosamente, estos mediadores, tradicionalmente asociados a una función exclusivamente inmunitaria, también sirven de comunicación con las neuronas y la glía y tienen la capacidad de influir en la función sináptica (Stevens et al., 2007), la plasticidad neuronal (Huh et al., 2000) y la neuroprotección (Farina et al., 2007). De forma similar, se ha descrito que la expresión de receptores de neurotransmisores en células del sistema inmune puede influir en la propia función inmunológica, por ejemplo, la implicación de los receptores catecolaminérgicos de las células inmunes cuya activación por la adrenalina circulante disminuye el número y la actividad de las células inmunes participando en el síndrome SIID.

Éstas, y otras evidencias, indican que muchos de los elementos que se creían propios de uno u otro sistema se comparten y complementan, involucrando estrechamente al sistema inmune en el destino del cerebro isquémico y en su supervivencia tras una isquemia cerebral.

### 1.3.1.3. Infiltración celular

Aunque la participación de la inflamación y de la inmunidad en la recuperación tisular está muy bien documentada y establecida en otros órganos, se sabe realmente poco de estos procesos en el cerebro. Para prevenir la progresión primaria y secundaria del infarto, es indispensable que se esclarezcan los mecanismos detallados de la inflamación post-isquémica provocada por estas células inmunes. Se sabe que los macrófagos y neutrófilos son participantes claves en la inflamación, pero los mecanismos responsables de su activación aún se desconocen. También se ha visto la participación de las células T en la inflamación cerebral retrasada. (Shichita et al., 2012a). La cinética del reclutamiento de las diferentes células inflamatorias aún está bajo debate pero está comúnmente aceptado que los neutrófilos lideran la migración al parénquima cerebral, seguido por macrófagos y linfocitos (Jin et al., 2010) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Esquema de la dinámica temporal de la inflamación post-ictus. Se muestra el orden de reclutamiento de las células inflamatorias en el cerebro isquémico. Modificado de (Gelderblom et al., 2009; Jin et al., 2010)

En los modelos de ratón de isquemia cerebral focal por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se da un efecto bifásico del ictus sobre el sistema inmune periférico. La fase inicial se caracteriza por la señalización temprana del cerebro isquémico al bazo, lo que resulta en una producción masiva de factores inflamatorios y la trans migración de esplenocitos a la circulación. La segunda fase consiste en la infiltración de leucocitos a las áreas del cerebro dañadas por el ictus (Catania et al., 2009).

Se podría decir que la infiltración de células en el cerebro tiene tanto aspectos beneficiosos como deletéreos y, probablemente, la mejor visión del efecto de la inflamación en el ictus sea en términos de coste versus beneficio. De ahí la importancia del estudio de la dinámica de la inflamación en el ictus con el fin de poder aplicar las terapias inmunomoduladoras más beneficiosas para el paciente, ya que, aunque la infiltración celular tras un ictus posee un papel deletéreo potenciando el daño tisular, algunos trabajos recientes demuestran que también pueden estar implicados en procesos de reparación. A continuación, describimos los subtipos de los principales tipos de células periféricas reclutadas en el cerebro y sus diversas funciones.

### **Neutrófilos**

Los neutrófilos son la primera célula inmune circulante que se infiltra en el cerebro isquémico (desde los 30 minutos hasta unas pocas horas tras producirse la isquemia cerebral), mostrando un pico de 1 a 3 días y desapareciendo después paulatinamente (Yilmaz and Granger, 2008; Jin et al., 2010). En algunos estudios se ha visto también que el grado de infiltración de neutrófilos correlaciona con la gravedad del daño neurológico (Price et al., 2004). Los neutrófilos han sido tradicionalmente los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en el ictus isquémico agudo. La infiltración de neutrófilos al cerebro isquémico se ha asociado con un incremento del daño tisular debido a varios mecanismos inflamatorios, como la adhesión al endotelio y la activación de las rutas del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) con la consiguiente generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) o la secreción de proteasas (Segel et al., 2011). Existen además evidencias recientes que indican que los neutrófilos podrían adquirir diferentes fenotipos y contribuir a la resolución de la inflamación a través de la liberación de mediadores anti-inflamatorios. Por tanto, al igual que en el caso de los macrófagos M2, los neutrófilos pueden polarizarse a un fenotipo N2 (Mantovani et al., 2011; Cuartero et al., 2013).

### **Monocitos/macrófagos**

La microglía y los monocitos/macrófagos derivados de la sangre son morfológica y funcionalmente similares tras producirse un ictus. La activación de la microglía ocurre en primer lugar (a los minutos del comienzo de la isquemia) e induce la producción de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , lo cual exacerba el daño tisular. Tras la rápida activación de las células residentes, las células procedentes de la sangre se infiltran en el tejido isquémico en las siguientes horas a días (Schilling et al., 2003; Chiba and Umegaki, 2013). La primera función que adquieren estas células es la de eliminar restos de células muertas y liberar citoquinas que atraigan a más células inmunes al lugar del daño (Yilmaz and Granger, 2008).

Los macrófagos se dividen en las dos subpoblaciones denominadas M1 y M2 dependiendo de su fenotipo. Los macrófagos con fenotipo denominado clásico o M1 son de tipo inflamatorio ya que incrementan la secreción de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-12 o IL-1 $\beta$  y aparecen en la fase “tóxica” inicial de la respuesta inmune (Colton, 2009). Este fenotipo es claramente beneficioso para la defensa del huésped ante patógenos, pero presenta un importante componente deletéreo en la isquemia cerebral. De manera opuesta, los macrófagos M2 o alternativos promueven la reparación y la reconstrucción tisular a través de la actividad fagocítica intensificada y la producción de mediadores inflamatorios reducida (Gordon and Martinez, 2010; Hu et al., 2012b). El organismo es capaz, de manera fisiológica, de reducir esta fase tóxica inicial, resolver la infección o el daño y restaurar la homeostasis tisular. Por lo tanto, la respuesta inmune innata al daño evoluciona hacia un estado donde se requiere el reemplazamiento de las células perdidas o dañadas y la reparación de la matriz extracelular. Haciendo un paralelismo entre los fenotipos M1 y M2 con los monocitos pro-inflamatorios CD14+ y los monocitos reparadores CD16+ respectivamente, se vio que el balance entre monocitos CD14+ pro-inflamatorios y monocitos CD16+ reparadores estaba asociado al pronóstico funcional tras un ictus (Urra et al., 2009).

## **Linfocitos**

El reclutamiento de linfocitos T está implicado en las etapas más tardías del daño cerebral isquémico (Stevens et al., 2002). El pico de infiltración de estas células se da principalmente alrededor del día 3 y se mantiene hasta el día 7 (modelo tromboembólico). Los dos subconjuntos de células T son las células T citotóxicas (Tc), que son capaces de aumentar el tamaño de infarto ya que atacan tanto al tejido dañado como al sano que hay alrededor, y las células T helper (Th), que también aumentan la reacción inflamatoria activando macrófagos y promoviendo la producción de anticuerpos por las células B. Además, las células Th constan de diferentes subpoblaciones que incluyen las células Th1, que están más implicadas en la inmunidad mediada por células y que liberan mediadores pro-inflamatorios IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Yilmaz et al., 2006), las células Th2, que promueven inmunidad humoral y producen citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-13 (Pelidou et al., 1999). (Liew, 2002) y, por último, las células Treg, que tienen efectos supresores generalizados sobre otros linfocitos y secretan citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10 (Scheffold et al., 2007).

Los linfocitos tienen una función crucial en los procesos inflamatorios y están estrechamente relacionados con los efectos deletéreos en el ictus. Este hecho se comprobó tras la administración del inmunosupresor fingolimod que, entre otros efectos, inhibe la infiltración de células T en el tejido inflamatorio, y que reduce los volúmenes de infarto en modelos de isquemia en ratón (Macrez et al., 2011).

### **1.3.2. La inmunidad innata en la isquemia cerebral: receptores toll-like**

#### **1.3.2.1. Receptores toll-like (TLRs): origen, estructura y ligandos**

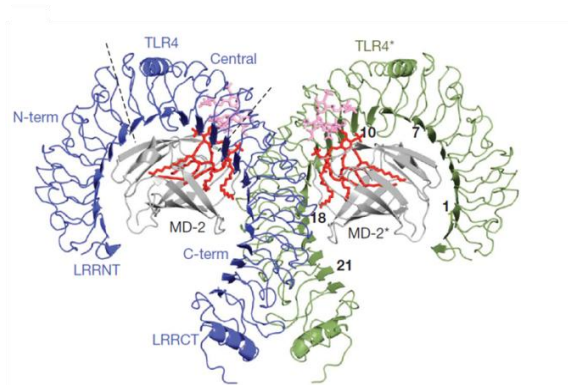
Los receptores toll-like (TLRs) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) responsables de la identificación de patrones moleculares conservados asociados a patógeno (PAMPs) o a daño celular (DAMPs). Los TLR se identificaron inicialmente en *Drosophila melanogaster* como receptores Toll por su papel en el establecimiento de la polaridad dorsoventral en el desarrollo embrionario (Hashimoto et al., 1988). La primera demostración de que Toll estaba implicado en la inmunidad del

huésped se dio en 1996 cuando se observó que las moscas *Drosophila* deficientes de Toll eran vulnerables a experimentar infecciones por ciertos hongos (Lemaitre et al., 1996). Posteriormente, los homólogos en mamíferos fueron llamados receptores tipo toll (“toll-like”). En humanos se han identificado 10 TLRs y en ratón 13 (Akira et al., 2006; Beutler et al., 2007; Medzhitov, 2007). La familia de los TLRs se divide en receptores extracelulares e intracelulares. Los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 se localizan en la superficie celular para reconocer a sus ligandos (PAMPs y DAMPs). Por el contrario, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan intracelularmente en compartimentos endosomales o lisosomales y en el retículo endoplasmático (Bode et al., 2012).

El primero de estos receptores que se describió fue TLR4. En 1998 se identificó una mutación en el gen TLR4 de distintas cepas de ratón que les provoca una respuesta reducida al lipopolisacárido de la pared de las bacterias gram negativas (Politorak et al., 1998). Desde entonces, los TLRs en mamíferos han sido un foco muy importante en el campo de la inmunología. Tanto es así que los autores de los dos trabajos mencionados anteriormente, Bruce Beutler (Politorak et al., 1998) y Jules A. Hoffmann (Lemaitre et al., 1996), fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 2011 por estos hallazgos.

Estructuralmente, los TLRs son glucoproteínas transmembrana tipo I con tres tipos de dominios: 1) dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina, que son las responsables de unirse al ligando y forman una superhélice “diestra” que se extiende a lo largo del dominio y adopta la forma de una herradura; 2) dominio transmembrana; 3) dominio citoplasmático homólogo al de interleukina 1(IL-1) y que por tanto se denomina dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR, del inglés *Toll/interleukin-1 receptor*) (Kondo et al., 2012). Las porciones extracelulares de ambos tipos de receptores no están relacionadas estructuralmente. Los receptores de IL-1 poseen un dominio tipo inmunoglobulina, mientras que los TLRs se componen de las repeticiones ricas en leucina. Los miembros de la familia TLR contribuyen tanto a las interacciones célula-célula como a la señalización que une señales extracelulares a programas de expresión de genes específicos. TLR4 es el único que requiere un co-receptor para unirse al ligando (Figura 1.9). Este co-

receptor es una glicoproteína pequeña de unión a lípidos conocida como factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2) (Park et al., 2009).



**Figura 1.9. ESTRUCTURA CRISTALIZADA DEL HOMODÍMERO DE TLR4.** La dimerización de estos receptores es dependiente de unión a ligando. En este caso, vemos que dos complejos formado por TLR4-MD2 interaccionan simétricamente para formar el homodímero de TLR4 (Park et al., 2009).

Los receptores Toll de *Drosophila* y los receptores toll-like de mamíferos se han identificado como reguladores clave de las respuestas inmunes actuando como centinelas, concretamente en el reconocimiento directo de agentes infecciosos que se lleva a cabo por la señalización a través de NF- $\kappa$ B que conduce a la iniciación tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Los TLRs de mamíferos reconocen directamente productos procedentes de distintos tipos de microorganismos, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos. Son los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Tabla 2). Por lo tanto, los TLRs representan la primera línea de defensa del huésped contra patógenos y tienen un papel fundamental en la inmunidad tanto innata como adquirida. Pero los TLRs también pueden reconocer una serie de ligandos endógenos (DAMPs) procedentes de células que están muriendo (o muertas) que liberan estas moléculas que los receptores interpretan como “señales de peligro” y les permitirá activar la señalización intracelular necesaria para repararlo (Tabla 3).

La unión a los ligandos promueve la homodimerización (TLR3 y TLR4) o la heterodimerización (TLR1, TLR2 y TLR6) del receptor que se inicia por enlaces cruzados entre ectodominios, los cuales a su vez provocan que los dominios de señalización intracelular de los receptores se aproximen. El dominio de señalización está compuesto por el dominio del receptor Toll-IL-1

(TIR), el cual está presente también en las proteínas adaptadoras intracelulares MyD88 y TRIF.

Se ha visto que los distintos TLRs se expresan en casi todos los tipos de células del SNC: células madre y progenitores neurales (Rolls et al., 2007) neuronas (Préhaud et al., 2005), astrocitos (Pernhorst et al., 2013), oligodendrocitos (Bsibsi et al., 2002) y microglía (Lehnardt et al., 2002; Olson and Miller, 2004) y cada TLR juega un papel biológico específico. Mientras que TLR4 es el único TLR que media tanto las respuestas de citoquinas proinflamatorias como de interferón tipo I, los dímeros de la superficie celular TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 y TLR5 están sólo implicados en la inducción de citoquinas inflamatorias. Las diferentes moléculas adaptadoras que mencionábamos antes que contienen dominios TIR están asociadas a TLRs específicos y median o modulan su señalización intracelular (O'Neill and Bowie, 2007).

RECEPTOR	LIGANDOS (PAMPs)
TLR1	Triacil lipoproteína
TLR2	Lipoproteínas Triacil lipoproteína Diacil lipoproteína, LTA, zymosan
TLR3	ARNds
TLR4	LPS, proteínas de desarrollo viral
TLR5	Flagelina
TLR6	Diacil lipoproteína, ácido lipoteicoico, zimosan.
TLR7	ARNss
TLR9	ADN, hemozoin
TLR11	Molécula tipo profilina Bacteria uropatogénica

**TABLA 2: Ligandos exógenos de los TLRs procedentes de virus y bacterias.** Modificado de (Kondo et al., 2012) (Ver lista de abreviaturas)

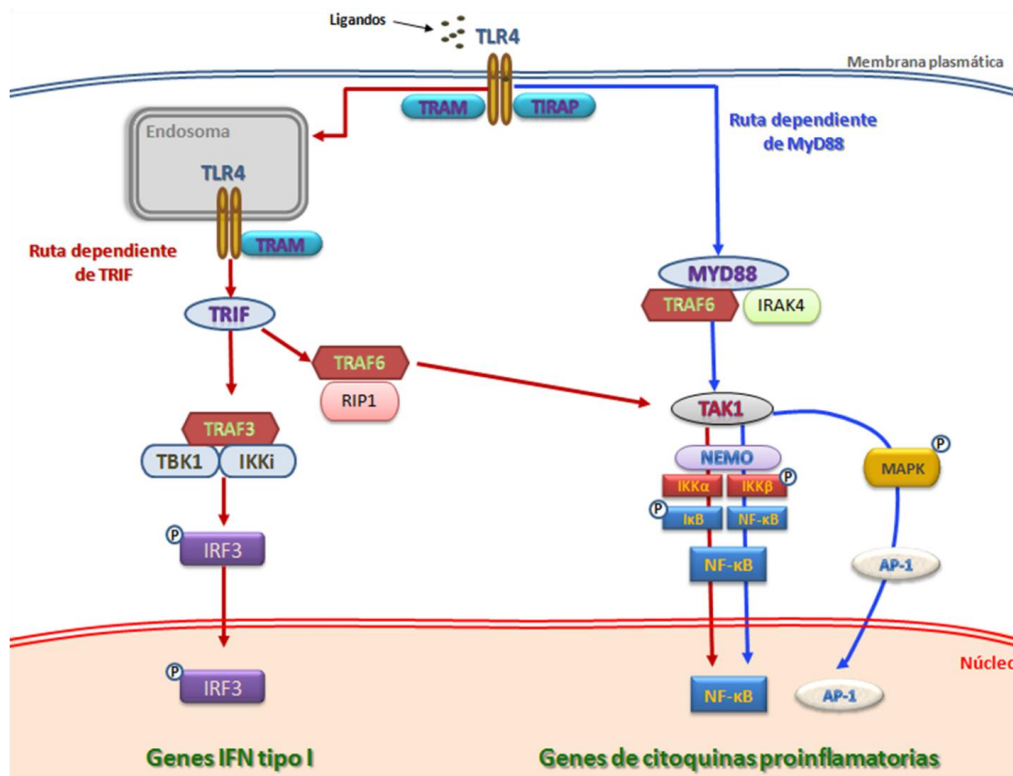


RECEPTOR	LIGANDOS ENDÓGENOS (DAMPs)
TLR2	Biglicano, endoplasmina, HMGB1, HSP60, HSP70, miosina cardiaca humana, ácido hialurónico, Gp96, beta-defensina3, proteína surfactante A y D cristales de urato monosódico neurotoxina derivada de eosinófilos, gangliósidos.
TLR3	ARNm y ARNs de interferencia pequeño (siRNA)
TLR4	Biglicano, CD138, cadena $\alpha$ -cristalina A, beta-defensina, endoplasmina, fibrinógeno, fibronectina, heparan sulfato, HMGB1, HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, ácido hialurónico, cristales de urato monosódico, OxPAPC, resistina, proteínas S100, proteína surfactante A y D, elastasa de neutrófilos, lactoferrina, gangliósidos, ácidos grasos saturados y tenascina-C
TLR7	ARN y ARNs de interferencia pequeño (siRNA)
TLR8	Miosina cardiaca humana y siRNA
TLR9	Complejos de cromatina-IgG, complejos inmunes de DNA y HMGB1

**TABLA 3: Ligandos endógenos de los TLRs mejor estudiados** (modificado de (Yu et al., 2010; Lee et al., 2013b) (Ver lista de abreviaturas)

### 1.3.2.2. Rutas de señalización de los TLRs

Tras el reconocimiento de sus respectivos DAMPs y PAMPs, los TLRs activan las rutas de señalización que proporcionan respuestas inmunológicas específicas. La respuesta específica iniciada por TLRs individuales depende del reclutamiento de una sola proteína adaptadora que contiene el dominio TIR o la combinación de éstas (MyD88, TIRAP, TRIF o TRAM) (Kawai and Akira, 2010). MyD88 es utilizado por todos los TLRs, excepto por TLR3. Esta proteína transmite señales hasta que activa NF- $\kappa$ B y MAP quinasas y se induce la producción de citoquinas inflamatorias. TLR3 y 4 utilizan TRIF para activar una ruta alternativa que conduce también a la activación de NF- $\kappa$ B e IRF3 y la inducción de interferón tipo I y la producción de citoquinas inflamatorias (Takeuchi and Akira, 2010). Por lo tanto, como anteriormente señalábamos, TLR4 es el único TLR que recluta las cuatro proteínas adaptadoras y activa dos rutas de señalización distintas: la ruta “dependiente de MyD88” y la ruta “dependiente de TRIF” (Kawai and Akira, 2010) (Figura 1.10).



**Figure 1.10. Rutas de señalización de TLR4:** En situaciones patológicas los DAMPs y PAMPs se liberan y son reconocidos por TLR4. La unión entre el receptor y el ligando recluta y activa primero la ruta dependiente de MyD88, que inicia una cascada de señalización que produce la activación de AP-1 y NF-κB e induce la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias. La otra ruta inducida por la activación de TLR4, conocida como ruta retrasada, es dependiente de TRIF y activa NF-κB e IRF3 que promueve la inducción de genes proinflamatorios e interferones tipo I. Figura adaptada de (Kawai and Akira, 2010)

Estas dos rutas tienen diferentes cinéticas. Así, TLR4 inicialmente recluta TIRAP y MyD88. TIRAP se localiza en la membrana plasmática vía su interacción con PIP2, donde sirve como puente entre MyD88 y TLR4 tras la unión a LPS. MyD88 activa las serina/treonina quinasas IRAK 1 y 4. Las IRAKs son entonces capaces de reclutar y activar el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF-6), un dominio ubiquitín ligasa que activa la quinasa TAK1 a través de poliubiquitinación. TAK1, a su vez, activa el complejo IKK, el cual fosforila IκBs (inhibidores de NF-κB) y los etiqueta para su ubiquitinación y posterior degradación. Esto libera a NF-κB que se mueve hasta el núcleo y regula sus genes diana, incluyendo a los que codifican citoquinas proinflamatorias y MAP quinasas (Kagan and Medzhitov, 2006). Posteriormente, se transloca TLR4 en la membrana plasmática y por rutas dependientes de dinamina y clatrina se endocita y se reparte por vesículas

intracelulares para formar un complejo con TRAM y TRIF, los cuales reclutan a TRAF3 y a las proteínas quinasas TBK1 e IKKi, las cuales catalizan la fosforilación de IRF3, que conduce a la expresión de interferón tipo I. TRAM-TRIF también reclutan a TRAF6 y TAK1 para mediar la activación tardía de NF- $\kappa$ B y MAP quinasas. Las vesículas intracelulares en las cuales TLR4 se distribuye son pequeños endosomas que reciclan la GTPasa Rab11a. Así, Rab11a regula específicamente la movilización de TLR4 de endosomas de reciclaje a fagosomas (Takeuchi and Akira, 2010; Kawai and Akira, 2011).

Cuando TLR4 finaliza su acción, es ubiquitinado y esto promueve su degradación. Hasta hace muy poco tiempo se pensaba que el único propósito para la movilización de TLR4 dentro de endosomas era permitir su degradación (Husebye et al., 2006). Sin embargo, algunas investigaciones recientes han revelado que esta internalización de TLR4 se requiere para una señalización completa. Esto se comprobó por Kagan y colaboradores que inhibieron la internalización de TLR4 en macrófagos y vieron que, aunque no había cambios en la ruta de NF- $\kappa$ B, la fosforilación de IRF3 estaba completamente abolida. Así, se dieron cuenta de que la internalización de TLR4 no servía sólo para reducir la señalización de TLR4, sino que permitía la activación de la vía TRAM-TRIF y la inducción de interferón tipo 1 en los endosomas (Kagan et al., 2008; Tanimura et al., 2008).

El descubrimiento de que TLR4 se transloca a los endosomas para activar la ruta del interferón tipo I (IFN) también resolvió el misterio de por qué TLR4 era el único receptor asociado a membrana que podía activar la ruta IRF3.

#### **1.3.2.3. Funciones fisiológicas de los TLRs**

Se sabe que los TLRs tienen diferentes papeles en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Aunque las funciones fisiológicas de los TLRs no están bien exploradas, se ha descrito su participación en procesos como la inflamación y la neurogénesis. En experimentos recientes se ha demostrado bajo condiciones fisiológicas, la inhibición de la proliferación neuronal por TLR4 sobre la neurogénesis hipocampal (Rolls et al., 2007) en ratones adultos. También se ha visto la participación de los TLRs en otros procesos no inmunes como el metabolismo óseo (Bar-Shavit, 2008) y el desarrollo cerebral (Ma et al.,

2007). Por otro lado, se ha estudiado la presencia de TLR4 en estructuras del SNC a las que se accede a través del torrente sanguíneo, como los órganos circunventriculares, los plexos coroideos y las leptomeninges (Laflamme and Rivest, 2001). El hecho de que TLR4 se exprese en estructuras desprovistas de BHE podría indicar un papel para el receptor como sensor para poner en marcha la respuesta inmune innata cerebral en caso de invasión durante una infección bacteriana sistémica.

#### **1.3.2.4. Funciones patológicas de los TLRs**

Se ha demostrado la implicación de los TLRs en diversas patologías lo que indica que es imprescindible su participación en la formación del proceso inflamatorio. Así, se ha demostrado que los TLRs intervienen en diversos tipos de cáncer (Kaczanowska et al., 2013), enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (Li et al., 2013), en artritis reumatoide (Radstake et al., 2004), en la enfermedad de Alzheimer (Fassbender et al., 2004; Jin et al., 2008), en la enfermedad de Parkinson (Stefanova et al., 2011), aterosclerosis (Ding et al., 2012), y en isquemia cerebral (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007). TLR4 se sobreexpresa en muchas enfermedades neurodegenerativas y de daño neuronal, y también aumenta la expresión cuando las neuronas se exponen a proteínas tóxicas y a productos de la peroxidación lipídica.

##### **1.3.2.4.1. TLR4 en el daño agudo por el ictus**

En la isquemia cerebral, nuestro grupo fue pionero en descubrir la implicación de TLR4 en el daño cerebral isquémico (Caso et al., 2007). Pero se sabe que no sólo TLR4 está implicado en el daño, sino que TLR2 también (Hyakkoku et al., 2010). De hecho, hay distintas evidencias experimentales que demuestran que la deficiencia de TLR2 o TLR4 atenúa significativamente el daño cerebral isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007) y suprime la expresión de citoquinas inflamatorias en células inmunes infiltradas un día después de la isquemia-reperfusión en ratones (Shichita et al., 2012b). Concretamente, se ha descrito en los ratones deficientes para TLR4 una menor expresión de mediadores inflamatorios cuando hay daño cerebral,

como IRF-1, iNOS y COX-2, menores niveles de IFN- $\beta$ , así como expresión reducida de las metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9) (Caso et al., 2007) .

El hecho de que los TLRs se expresen tanto en células circulantes como en células cerebrales hace difícil comprender los complejos mecanismos inflamatorios de su activación en el cerebro isquémico. También queda por aclarar si el efecto de los TLRs sobre las células cerebrales es neurotóxico o neuroprotector. Las células cerebrales, que se activan por daño isquémico, también contribuyen a la inflamación post-isquémica produciendo mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO) y MMPs que regulan la permeabilidad cerebrovascular y aumentan el edema cerebral (Takano et al., 2009). Pero los TLRs también han sido implicados en procesos de neuroprotección como en el próximo apartado veremos.

No se conoce bien el papel de la expresión cerebral o periférica de TLR2 y TLR4 en el ictus pero estudios recientes en modelos de isquemia cardiaca en los que se usó médula ósea de ratones quiméricos mostraron que cuando los ratones que expresaban de forma normal TLR2 se trasplantaron con médula ósea de ratones deficientes para TLR2 se observaba mayor protección en el daño por isquemia y reperfusión cardiaca mostrando así una contribución periférica muy elevada (Arslan et al., 2010). Más aún, en otro estudio en el que se trasplantaba la médula ósea entre animales TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se observó que los TLR4<sup>+/+</sup> que recibían médula de los TLR4<sup>-/-</sup> presentaban una reducción significativa del edema y del tamaño del infarto cerebral, mostrando de nuevo, en este caso, una elevada contribución periférica en la génesis del daño isquémico (Yang et al., 2011).

#### **1.3.2.4.2. TLR4 como mecanismo neuroprotector**

También se ha visto que los bajos niveles de activación de TLR4 son beneficiosos para el sistema nervioso central y que conducen a una respuesta inmune leve, y una producción de interferón y muerte neuronal reducidas. Por ejemplo, bajas dosis de LPS aplicadas en el SNC (Vartanian et al., 2011) o cortos eventos isquémicos (Pradillo et al., 2009), disminuyen el daño neuronal en la lesión posterior, en un fenómeno conocido como preconditionamiento isquémico. Se ha visto que TLR4 participa en el preconditionamiento isquémico (PCI) (Konstantinov et al., 2004; Pradillo et al., 2009). La

señalización de TLR4 activa NF- $\kappa$ B, que conduce a la expresión de TNF, iNOS y COX-2, lo cual es requerido para evocar un efecto de preconditionamiento. Por último, la microglía activándose a través de la ruta de señalización de TLR, produce factores neurotróficos para la reparación tisular (Lai and Todd, 2006).

### **1.3.3. La inmunidad adquirida en la isquemia cerebral**

La respuesta de la inmunidad adquirida representa un salto evolutivo que confiere un mecanismo de defensa mucho más eficaz contra infecciones y daño celular que la propia inmunidad innata. La respuesta adquirida es más tardía, requiere un periodo de tiempo, necesita de la participación de los linfocitos y tiene “memoria” de procesos previos.

La respuesta se inicia cuando los DAMPs preparan a las células dendríticas (CD) para reconocer los antígenos. Se sabe que las CD son una clase especial de células presentadoras de antígenos (APCs) que constituyen el nexo de unión entre la inmunidad innata y la adquirida. Se ha descrito que las APCs y en particular las CD se acumulan en el parénquima cerebral tras la isquemia, y dicho aumento coincide con el pico de infiltración de linfocitos. No se conoce cuál es la función exacta de estas células, pero se sabe que ponen en marcha el reconocimiento de los antígenos cerebrales (como la proteína básica de mielina –MBP– y péptidos relacionados) por parte de los linfocitos T. A su vez los linfocitos B producen anticuerpos frente a dichos antígenos. Esta respuesta adquirida tiene el potencial de inducir fenómenos de autoinmunidad frente a antígenos propios; sin embargo, no está claro si los procesos de autoinmunidad son deletéreos o beneficiosos (Iadecola and Anrather, 2011; Chamorro et al., 2012). Podrían ser deletéreos ya que, tras el reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T infiltrantes, éstos responden proliferando y diferenciándose a células efectoras con propiedades citotóxicas y citoprotectoras. Los linfocitos T y las células  $\gamma\delta$ T, a través de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 respectivamente, tienen una función crucial en los procesos inflamatorios que potencian el daño, como se demuestra por el hecho de que los animales deficientes en linfocitos T presentan menor daño isquémico (Yilmaz et al., 2006; Hurn et al., 2007).

De forma contraria, los procesos autoinmunes pueden ser beneficiosos ya que las células T autoinmunes y otra subpoblación de linfocitos T, los T

reguladores (Treg) son citoprotectores y promueven la reparación tisular (Moalem et al., 1999; Becker, 2009). Así por ejemplo, la inducción de tolerancia inmunológica por aplicación de antígenos cerebrales previo a la isquemia produce un menor infarto cerebral y promueve la reparación (Becker, 2009); las propias neuronas, los astrocitos y la microglía, mediante la producción de TGF- $\beta$ , promueven el desarrollo de linfocitos Treg que secretan citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y TGF- $\beta$  que son protectores; de hecho, las células Treg son protectoras en modelos de isquemia experimental (Liesz et al., 2009).

#### **1.4. NEUROGÉNESIS E ICTUS**

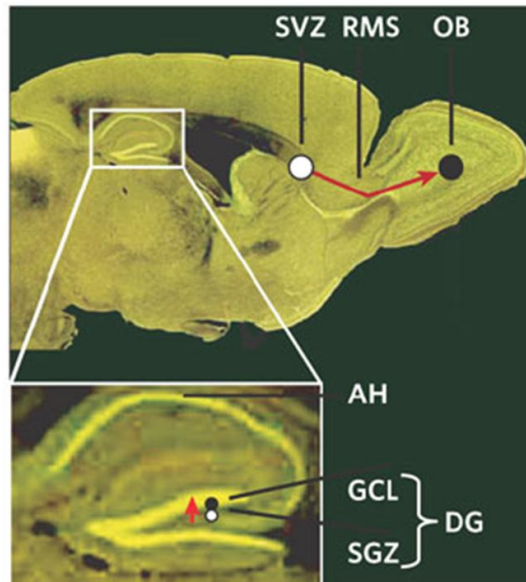
Se ha observado que, después de sufrir un ictus, los pacientes experimentan un lento pero persistente proceso espontáneo de recuperación que tiene lugar durante meses. Considerando que gran parte de la recuperación inicial se debe fundamentalmente a la resolución del edema, la recuperación tardía es debida a procesos de neurorreparación que potencian la plasticidad cerebral. En los últimos años, se ha demostrado que los tratamientos moduladores para la reparación cerebral, como son las terapias basadas en factores tróficos (VEGF, BDNF, NGF, G-CSF) y en células madre, pueden promover plasticidad cerebral a través de procesos como la neurogénesis, sinaptogénesis y angiogénesis, todo lo cual tendrá un impacto positivo sobre la recuperación funcional (Kalladka and Muir, 2014; Liu et al., 2014).

##### **1.4.1. Neurogénesis adulta**

Se define neurogénesis como el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales procedentes de precursores en el SNC, tanto de neuronas como de células gliales, procedentes de células madre neurales.

En 1962, Joseph Altman fue el primero en describir nuevas neuronas en el cerebro adulto (Altman, 1962; rev. en Arvidsson et al., 2001) ya que, hasta entonces, se pensaba que la neurogénesis era un proceso restringido al desarrollo embrionario. En 1977, se demostró la generación de nuevas neuronas en el giro dentado y el bulbo olfatorio de ratas adultas (Kaplan and Hinds, 1977). En condiciones basales, la neurogénesis se produce en dos regiones del cerebro adulto: en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del

hipocampo, de la cual las nuevas neuronas migran hacia la capa de células granulares, y en la zona subventricular (ZSV) que ocupa la pared externa de los ventrículos laterales del cerebro anterior, de la cual los neuroblastos migran a través de la ruta migratoria rostral al bulbo olfatorio (Figura 1.11.). (Para revisión ver (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).



**Figura 1.11.** Sección sagital mostrando las dos zonas neurogénicas del cerebro adulto: la zona subventricular (SVZ) desde donde los neuroblastos migran a lo largo de la ruta migratoria rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (OB); y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo desde donde las células migran hasta la capa granular adyacente (GCL). (Greenberg and Jin, 2005)

El proceso de neurogénesis se compone de 3 fases: proliferación, migración y diferenciación y supervivencia. Cada una de estas fases se regula por diferentes mecanismos que iremos describiendo más adelante.

#### 1.4.1.1. Etapas de la neurogénesis

##### - Proliferación

Las células que proliferan en los nichos neurogénicos son las células madre y los progenitores neurales. Las células madre neurales (NSCs) exhiben tres características cardinales:

- 1- Capacidad de auto-renovación, teóricamente ilimitada para producir progenie similar a ella.
- 2- Capacidad proliferativa, que les permite continuar sufriendo mitosis (con ciclos celulares bastante largos).



3- Capacidad multipotente para producir los distintos linajes neuroectodérmicos del SNC, que incluyen la producción de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Las células madre neurales (NSCs) de la ZSV se pueden identificar mediante diferentes marcadores (Figura 1.12 y 1.13) y por su capacidad para formar neuroesferas que dan lugar a múltiples tipos celulares in vitro (Reynolds and Weiss, 1992; Sohur et al., 2006).

Las células progenitoras neurales, en cambio, poseen una capacidad de autorrenovación y un potencial de diferenciación limitados.

#### **- Migración de neuroblastos desde la ZSV**

La migración constitutiva se da desde la ZSV, donde los neuroblastos migran de forma tangencial a lo largo de la ruta migratoria rostral (RMS) y llegan hasta el bulbo olfatorio (para revisión (Cayre et al., 2009)). Los neuroblastos forman cadenas y migran uno tras otro bajo la influencia de moléculas de superficie celular, como PSA-NCAM, proteínas de matriz extracelular y factores tróficos (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Hu et al., 1996; Hagg, 2005). Las cadenas de neuroblastos están estrechamente asociadas a los vasos sanguíneos que forman un soporte migratorio y median la migración de neuroblastos a través de la señalización por BDNF (Snapyan et al., 2009; Whitman et al., 2009). Los procesos gliales de los astrocitos acompañan a las cadenas de neuroblastos para formar los tubos gliales y regular los movimientos celulares vía señalización por GABA (Bolteus and Bordey, 2004). La presencia de sustratos inhibidores y atrayentes en la RMS y la falta de espacio disponible en los circuitos adultos para permitir la integración de nuevas células, en general, restringe la migración de las NSCs y de los progenitores neurales para remplazar tipos específicos de neuronas y glía en distintas regiones del SNC (Christie and Turnley, 2012).

#### **- Diferenciación y supervivencia de nuevas neuronas**

En el proceso fisiológico de la neurogénesis, los neuroblastos alcanzan su destino en el bulbo olfatorio o en la capa granular del giro dentado donde se diferencian a neuronas maduras y se integran funcionalmente en el tejido

(Paton and Nottebohm, 1984). Pero son muy pocas las nuevas neuronas que sobreviven a largo plazo (Kempermann et al., 2003). De hecho, la mayoría de células nuevas es eliminada por apoptosis durante los primeros días y la microglía es la encargada de fagocitarlas (Sierra et al., 2010; Gemma and Bachstetter, 2013).

Es importante poder identificar los distintos tipos celulares que llevan a cabo cada etapa del proceso neurogénico y, para ello, hay una serie de marcadores celulares que nos permiten distinguirlas y poder clasificarlas de una forma más precisa y detallada (Figuras 1.12 y 1.13).

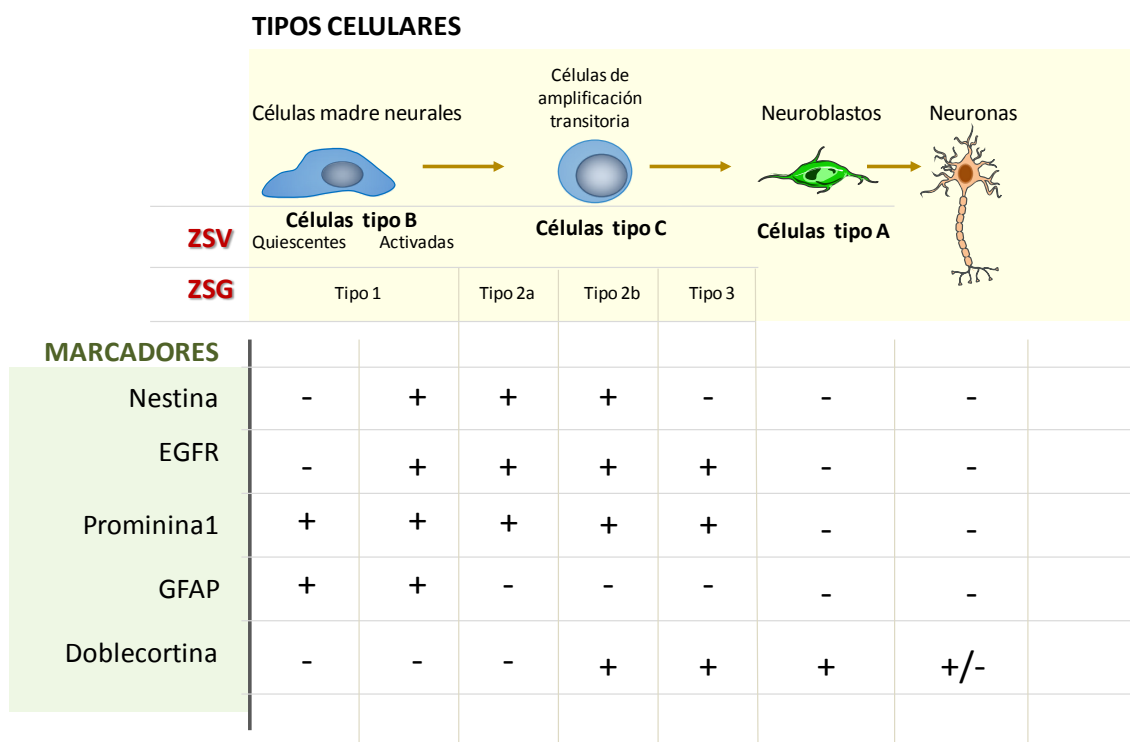


Figura 1.12. Marcadores para identificar células en los nichos neurogénicos (conclusiones extraídas de (Kempermann et al., 2004; Pastrana et al., 2009; Ming and Song, 2011; Codega et al., 2014)

#### 1.4.1.2. Modelo de neurogénesis adulta de Kempermann

La neurogénesis adulta, en comparación con la embrionaria, tiene una serie de limitaciones que conviene repasar para abordar mejor su estudio. Ambas difieren, al menos, en dos aspectos fundamentales. La neurogénesis adulta procede de un ambiente que no está programado para promover neurogénesis porque su propio desarrollo ha cesado. El desarrollo neuronal en el adulto requiere el mantenimiento de un microambiente permisivo. La segunda diferencia fundamental es que la neurogénesis adulta ya no muestra

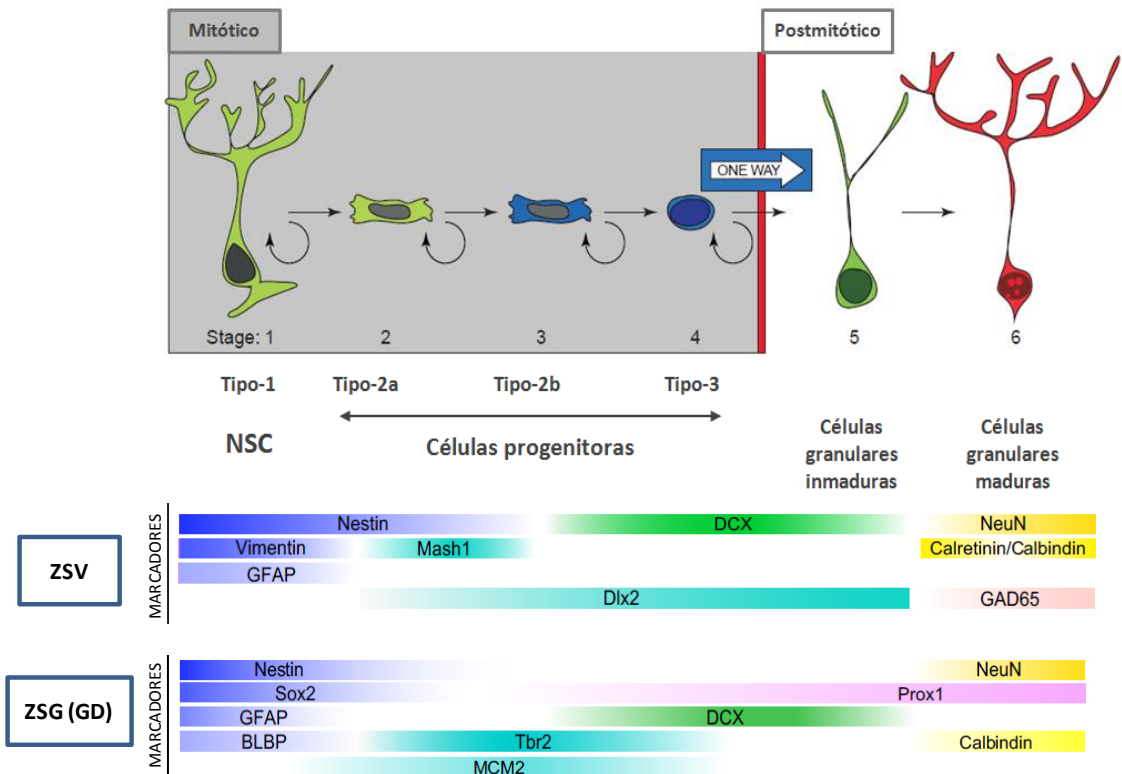
nada de la progresión masiva de los distintos estados de desarrollo. En el hipocampo adulto, en un mismo instante podemos encontrar neuronas de todos los estados de desarrollo. Por tanto, la neurogénesis adulta es un proceso individualizado, no un evento poblacional (Kempermann et al., 2004).

El principal problema que hay con la descripción bastante superficial que se hace hoy en día de la neurogénesis adulta es que: i) no refleja que la población de células que se divide sea heterogénea, ii) la neurogénesis está intercalada o mezclada con la gliogénesis, iii) la mayoría de las células generadas *de novo* mueren, iv) no está claro en qué momento del desarrollo se decide la elección de destino hacia la diferenciación neuronal y dónde está el punto de restricción crucial de “no retorno” (Kempermann et al., 2004).

Kempermann y colaboradores proponen un modelo de desarrollo en seis fases (Figura 1.13), basado en criterios tanto morfológicos como de expresión de algunos marcadores clave. Estas seis fases son: (el uso de nomenclatura distintivo que hacen para el hipocampo tiene la intención de evitar que se equipare conceptualmente y de forma prematura con la situación en la ZSV)

- Fase 1: se dividen las células madre (células tipo 1) y dan lugar a las células tipo 2. Estas células expresan el marcador astrocítico GFAP y nestina y se cree que se dividen asimétricamente. Estas células tienen apariencia de glía radial (en la zona ventricular embrionaria tienen propiedades de célula madre y potencial neurogénico dependiente de región). En el hipocampo, las células tipo glía-radial proporcionan el andamiaje necesario para el desarrollo normal del giro dentado.
- Fases 2 a 4: son tres fases consecutivas de células progenitoras que se amplifican transitoriamente y que difieren entre sí por su potencial proliferativo y su diferenciación neuronal; las células tipo 2 tienen una morfología distinta que sugiere capacidad de migración tangencial. Son GFAP negativas y muy proliferativas. Hay dos subtipos, ambos nestina positivos: el subtipo a, negativo para doblecortina, y el subtipo b, positivo para doblecortina. Las células tipo 3 son positivas para doblecortina y negativas para nestina y también son proliferativas.
- Fase 5: estado posmitótico transitorio, durante el cual se establece la red de conexiones y se da la selección de supervivencia a largo plazo. Persiste la expresión de doblecortina y también se expresa calretinina.

- Fase 6: diferenciación a nuevas células granulares que expresan calbindina.



**Figura 1.13. Secuencia de tipos celulares propuesta en neurogénesis adulta.** Son seis estados de desarrollo neuronal basados en la morfología, la capacidad proliferativa y la expresión de distintos marcadores. Adaptada de (Kempermann et al., 2004; Ming and Song, 2011).

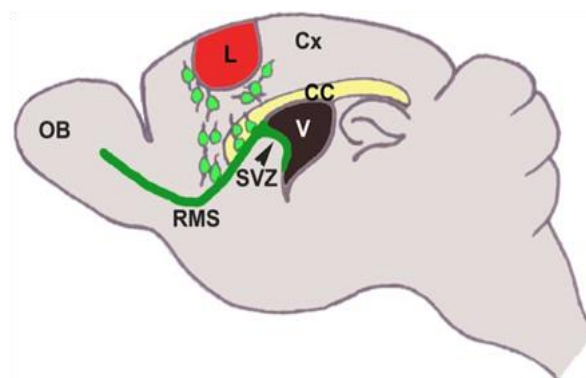
### 1.4.2. Neurogénesis adulta e ictus

En 1998, Liu et al. fueron los primeros en describir la neurogénesis en el giro dentado después de la **isquemia** global en los jerbos (Liu et al., 1998). A partir de entonces, varios trabajos confirmaron esta observación: la isquemia cerebral induce un aumento de la neurogénesis en la ZSG (Arvidsson et al., 2001) y en la ZSV en la rata (Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001). La neurogénesis también se ha descrito en el cerebro humano después de un ictus (Eriksson et al., 1998). Sin embargo, los mecanismos que regulan la neurogénesis son todavía bastante desconocidos.

#### 1.4.2.1. Migración de neuroblastos desde la ZSV tras ictus

Después de producirse la isquemia, un gran número de neuroblastos de la ZSV son capaces de superar la estrecha regulación que existe para salir de

su ruta normal y migrar hacia la región de tejido infartado (Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003; Saha et al., 2012) (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Representación sagital del cerebro en el que se muestra cómo algunos neuroblastos se desvían de su ruta migratoria hacia la lesión cortical (Saha et al., 2012). OB (Bulbo olfatorio); Cx (corteza); CC (cuerpo calloso); SVZ (Zona subventricular); V (ventrículo); RMS (ruta migratoria rostral); L (lesión isquémica)

La migración de neuroblastos hacia el daño comienza de 3 a 4 días tras el ictus y permanece durante varias semanas, llegando incluso a 4 meses (Thored et al., 2007). Los neuroblastos se dirigen hacia la zona infartada gracias a las interacciones que se llevan a cabo con otras células y con distintas señales moleculares. En el tejido cerebral dañado, el ambiente es totalmente diferente al del nicho neurogénico adulto normal o al del sistema nervioso en desarrollo. Este ambiente de daño produce una gran influencia sobre la función de las NSCs que en algunos casos parecen tener anulado su programa normal de destino. Este es el caso de los estudios experimentales con NSCs de la ZSV, que pueden recibir el estímulo de daño lejos de su ruta migratoria normal (hacia el bulbo olfatorio) y ser capaces de desviarse hacia el sitio del daño neuronal, un proceso en gran medida inducido por mediadores inflamatorios (Christie and Turnley, 2012).

#### **1.4.2.2. Diferenciación e integración de neuronas maduras tras ictus**

Tras un ictus, la cantidad de células nuevas diferenciadas en la corteza es muy superior a las que hay en condiciones fisiológicas. Estas células nuevas se desvían de su trayectoria hacia la zona dañada y se diferencian e integran allí. Pero, al igual que ocurre en condiciones fisiológicas, el porcentaje de neuronas nuevas que sobrevive a largo plazo es muy bajo. Las neuronas que

no sobreviven, mueren por apoptosis a los pocos días y son fagocitadas por microglía ameboide tras el daño tisular (Sierra et al., 2010).

## 1.5. FACTORES QUE MODIFICAN LA NEUROGÉNESIS

### 1.5.1. Respuesta inmune (TLR4)

Como ya se ha comentado previamente, TLR4 interviene en la inflamación que produce daño cerebral en la fase aguda del ictus. Sin embargo, la respuesta inflamatoria desencadenada por TLR4 podría desempeñar diferentes funciones como modulador de la neurogénesis. Actualmente, existe un gran debate sobre el doble papel de la inflamación como potenciador o supresor del proceso de neurogénesis (Russo et al., 2011). De hecho, se ha publicado que TLR4 inhibe la proliferación y diferenciación neuronal en condiciones fisiológicas (Rolls et al., 2007), que la microglía promueve la muerte de las células en desarrollo (Ekdahl et al., 2003; Marín-Teva et al., 2004) y que la administración de minociclina, que inhibe específicamente la activación de la microglía, es un tratamiento eficaz para restablecer la neurogénesis (Ekdahl et al., 2003).

A pesar de esto, se sabe que un proceso inflamatorio bien regulado es esencial para la reparación de tejidos y, de hecho, las evidencias sugieren que la microglía activada puede ser beneficiosa, por ejemplo, para promover la migración y la diferenciación de células precursoras neuronales (Aarum et al., 2003; Hanisch and Kettenmann, 2007) y por su función fagocítica eliminando células muertas en la zona afectada (Sierra et al., 2010). Las discrepancias entre las propiedades pro y anti-neurogénicas de la inflamación puede depender del tipo celular, como la microglía, los macrófagos y/o los astrocitos que se activen, pero también del entorno molecular y de la duración de la inflamación.

En este contexto, se ha descrito la implicación de varios TLRs (TLR4, 2, 3 y 8) en la modulación de la neurogénesis con diferentes funciones (Rolls et al., 2007; Lathia et al., 2008). Tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado que, mientras que TLR2 provoca un aumento en la neurogénesis, TLR4 induce una inhibición de la proliferación y diferenciación neuronal en condiciones fisiológicas (Rolls et al., 2007).

En resumen, no hay datos sobre el posible papel de los TLRs en la neurogénesis en el contexto de la isquemia cerebral. Si además consideramos que la isquemia induce un aumento en la expresión de los receptores, al menos de TLR2 y TLR4, la función que los TLR pueden tener en este contexto es variable en función de factores como el tipo celular que expresan TLRs, área cerebral, ligandos exógenos/endógenos, etc. Por ello, el estudio del papel de TLR4 en la neurogénesis es objetivo de esta tesis doctoral.

### **1.5.2. Envejecimiento**

El **envejecimiento** o senescencia es un proceso acumulativo de cambios moleculares deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción de la genética del individuo y el medio ambiente en el que se encuentra.

#### **1.5.2.1. Envejecimiento e ictus**

El ictus es una enfermedad que se padece principalmente en la vejez y, al igual que otras enfermedades cerebrales relacionadas con la edad y como se comentó al principio, es la principal causa de discapacidad física y mental para la cual no existe un tratamiento satisfactorio. Además, la vejez ha sido asociada con una mayor susceptibilidad a padecer ictus y a una pobre recuperación del tejido dañado (para revisión ver (Popa-Wagner et al., 2011).

A pesar de ser evidente que el envejecimiento es un factor de riesgo para el ictus (Seshadri et al., 2006), la mayoría de estudios experimentales de isquemia cerebral utilizan animales adultos jóvenes debido a que su disponibilidad es mayor, el coste más reducido y los problemas de salud también son menores. Pero esta circunstancia podría suponer que no se replicaran completamente los efectos de la isquemia sobre el tejido neural en animales viejos (Markus et al., 2005). Desde esta perspectiva, los modelos de ictus en animales viejos son clínicamente más relevantes para el estudio de la enfermedad ((STAIR), 1999; Moskowitz et al., 2013). La disparidad entre los estudios con modelos experimentales y los estudios clínicos podría deberse a la gran cantidad de cambios que se dan en el envejecimiento, como las alteraciones que ocurren en la barrera hematoencefálica (BHE), incluyendo la remodelación de la matriz extracelular, la expresión reducida de ocludinas, cambios en la composición lipídica y proteínica, alteraciones en nutrientes y

transporte de proteínas y reactividad reducida a la neurotransmisión  $\beta$ -adrenérgica. Estas alteraciones hacen a la barrera más vulnerable a un daño como la isquemia. El cese de flujo sanguíneo cerebral y la consiguiente falta de oxígeno en el tejido pueden conducir a una mayor permeabilidad de la BHE por una progresiva pérdida de componentes antigénicos de la lámina basal y la matriz extracelular, así como alteraciones en las interacciones entre las células endoteliales y entre matriz y célula (DiNapoli et al., 2008). Por otro lado, la edad avanzada se asocia con anomalías en el flujo glucolítico, en la producción de lactato, en la oxidación y en la producción de energía (Hoyer, 1987).

#### 1.5.2.2. Envejecimiento e inflamación

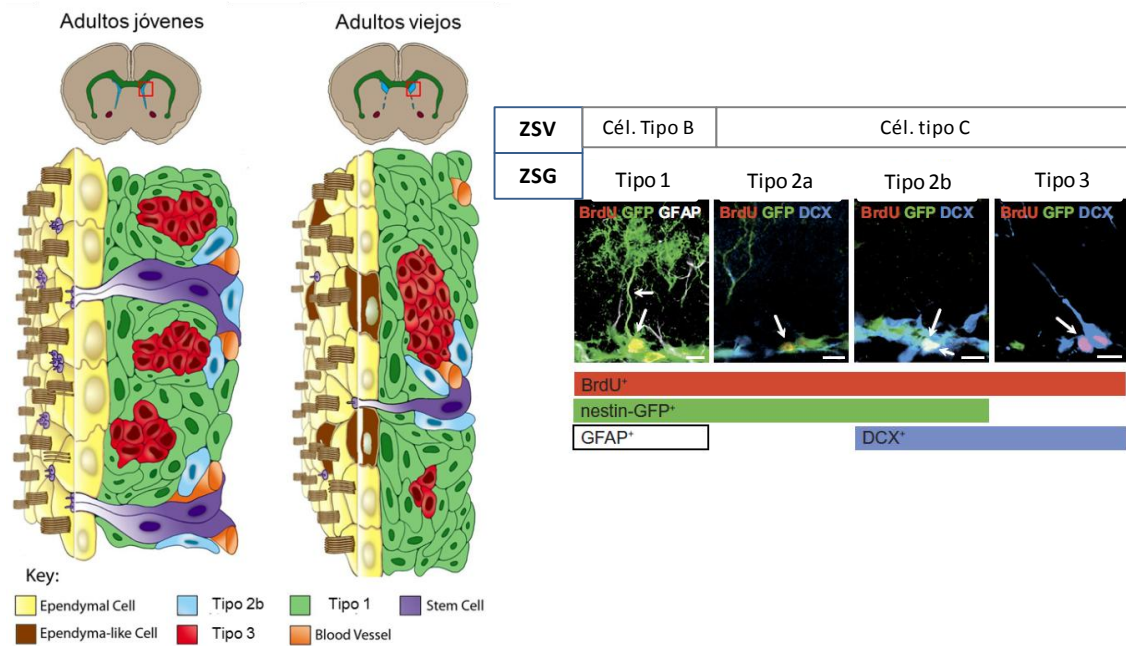
Con la edad avanzada, el sistema inmune va perdiendo la capacidad de dar una respuesta efectiva contra patógenos infecciosos o enfermedades, debido a cambios complejos que ocasionan un deterioro gradual denominado colectivamente **inmunosenescencia** (Chamorro et al., 2007). Esta condición se ha demostrado en diversas especies incluyendo a los seres humanos y contribuye a la morbilidad y la mortalidad debido a la mayor incidencia o reactivación de enfermedades infecciosas, así como el posible aumento de susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes y el cáncer. La disfunción inmune relacionada con la edad se caracteriza por cambios en células inmunes innatas, causada por la involución del tejido linfoide y la sobrecarga antigénica crónica. El estrés antigénico afecta al sistema inmune a lo largo de la vida con una activación progresiva y con la generación de respuestas inflamatorias implicadas en la fisiopatología de las enfermedades relacionadas con la edad (Conover and Shook, 2011). Pero, a esta situación compleja hay que añadir un fenómeno con características opuestas que se da simultáneamente en el envejecimiento y que se acuña como: “**inflamm-aging**” que se define como la inflamación crónica de bajo grado típica de la vejez (Franceschi et al., 2000). Es la reducción global en la capacidad de hacer frente a una gran variedad de factores de estrés y al aumento simultáneo de la inflamación, y que parece ser un factor biológico común en las enfermedades típicas de la vejez. La reacción inflamatoria local causada por el daño isquémico procede de un aumento de la microglía activada y de las células inflamatorias infiltradas, las cuales liberan citoquinas pro-inflamatorias y ROS en el sitio del daño (Popa-Wagner et al.,



2011). Otro evento celular importante asociado con una recuperación estructural y funcional reducida tras ictus en animales viejos es la formación temprana de la cicatriz en la región del infarto debido a un aumento prematuro de la proliferación celular post-isquemia en estos animales (Popa-Wagner et al., 2011).

#### **1.5.2.3. Envejecimiento y neurogénesis**

El envejecimiento fisiológico está asociado con una reducción progresiva en la capacidad regenerativa de muchos órganos, lo cual resulta en el deterioro y poca reparación del tejido dañado (Hamilton et al., 2013). Igualmente, la generación de nuevas neuronas va disminuyendo continuamente en el cerebro de los roedores. Este proceso se debe principalmente a la reducción general en la proliferación de precursores, que parece estar mediada principalmente por alteraciones relacionadas con la edad en el microambiente celular (Conover and Shook, 2011) (Figura 1.15). Se ha demostrado que esta reducción en la proliferación no sólo está causada por una reducción general en el número de precursores sino también por alteraciones en subtipos celulares específicos y en su actividad proliferativa. Así, por ejemplo, mientras que en animales jóvenes (3 meses) el tipo celular que más se estimula es la glía radial (o tipo 1) y el subtipo de célula precursora más diferenciada (o células tipo 2b), en animales viejos (16 meses) el tipo que se estimula son los precursores tipo 2a. (Walter et al., 2010) (Figura 1.15). También los cambios sistémicos dependientes de la edad pueden modular la neurogénesis tanto en nichos neurogénicos jóvenes como en viejos, que potencialmente contribuyen a la disminución de la capacidad regenerativa observada en el cerebro viejo normal (Villeda et al., 2011). Pero también se ha visto que la capacidad de la neurogénesis de responder al daño se mantiene en cerebros viejos (para revisión (Popa-Wagner et al., 2011)). Sin embargo, no hay consenso sobre si la neurogénesis está aumentada o reducida tras ictus en animales viejos (Jin et al., 2004; Darsalia et al., 2005) y sobre el papel de la “inflam-aging” en la neurogénesis tras ictus (Drapeau and Nora Abrous, 2008; Conover and Shook, 2011).



**Figura 1.15. Citoarquitectura comparativa de la ZSV en ratones jóvenes y viejos.** El cuadro rojo en cada sección de la parte superior corresponde a la representación detallada en la parte inferior (adaptada de la revisión (Walter et al., 2010; Conover and Shook, 2011))

A pesar de la reducción de la proliferación basal en la ZSV dependiente de la edad, el número de nuevas neuronas estriatales generadas por el ictus es similar en ratas jóvenes y viejas (Darsalia et al., 2005). La capacidad regenerativa en los viejos también es un área por explorar, a pesar del hecho de que la edad avanzada está asociada con una mayor susceptibilidad al ictus y una peor recuperación del daño cerebral (Popa-Wagner et al., 2011).



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. JUSTIFICACIÓN**

El ictus es una enfermedad devastadora que se posiciona como la segunda causa de muerte en el mundo y la primera de discapacidad a largo plazo. Aunque se ha llevado a cabo una gran inversión en la búsqueda de fármacos neuroprotectores, la traslación de terapias efectivas a nivel experimental ha fracasado en la clínica. De hecho, el único tratamiento aprobado es la recanalización del vaso ocluido por medio de la administración intravenosa de rt-PA, sin embargo, debido a los criterios de inclusión, muy pocos pacientes pueden beneficiarse de este tratamiento. Además, su uso está muy restringido por sus efectos secundarios, principalmente porque aumentan la transformación hemorrágica.

Existen diversos motivos por los que podría explicarse la falta de traslación a la clínica como son el uso de modelos experimentales inadecuados, el uso de animales jóvenes y sanos, las ventanas terapéuticas ensayadas, etc.

Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras y neurorreparadoras (potenciando procesos naturales endógenos como la neurogénesis), para el tratamiento en fase aguda y crónica de esta patología.

Además, el ictus es una enfermedad con más susceptibilidad a padecerse en la vejez, por tanto, deberían utilizarse animales de edad avanzada, tratando de imitar las condiciones que ocurren con más frecuencia en la clínica.

## **2.2. HIPÓTESIS**

El receptor TLR4 está implicado en el ictus isquémico, tanto en la fase aguda mediando el daño, como en una fase más tardía modulando procesos de neurorreparación (neurogénesis). Estos procesos son dependientes de la edad.

## **2.3. OBJETIVOS**

Los objetivos planteados para demostrar esta hipótesis son:

### **2.2.1. Estudio de la implicación del receptor TLR4 como mediador de daño en la fase aguda y de neurorreparación en la fase crónica.**

A – Estudio de la implicación del receptor TLR4 en el proceso de neurogénesis tras ictus isquémico, valorando la proliferación, migración y la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto.

B – Estudio de la implicación del receptor TLR4 en la inflamación tanto a nivel central (microgliosis en la zona de peri-infarto e infiltración) como a nivel periférico (circulación sistémica) tras ictus isquémico.

### **2.2.2. Estudio de la influencia de la edad**

A – Estudio de la influencia de la edad en el proceso de neurogénesis tras ictus isquémico, valorando la proliferación, migración y la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto.

B – Estudio de la influencia de la edad en la inflamación tanto a nivel central (microgliosis en la zona de peri-infarto e infiltración) como a nivel periférico (circulación sistémica) tras ictus isquémico.



# MATERIALES Y MÉTODOS







### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

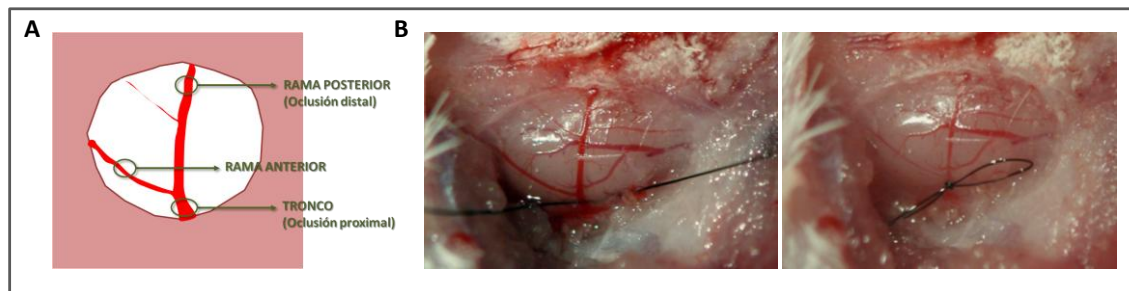
##### 3.1.1. Animales

Se utilizaron ratones macho C57BL/10ScNJ que no expresan TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) por una delección natural total del gen de TLR4; y ratones macho C57BL/10J que no expresan la mutación y que por tanto se consideran como grupo control (TLR4<sup>+/+</sup>). Los animales son de dos grupos de edad: adultos jóvenes (2-3 meses) y viejos (12-14 meses) procedentes de Jackson Labs, Bar Harbor, Me.

Todos los protocolos experimentales se rigieron por las directrices de experimentación animal del Comité de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE). Los ratones han permanecido bajo condiciones estándar de temperatura y humedad y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas con acceso libre a comida y agua.

##### 3.1.2. Modelo experimental. Inducción de isquemia focal permanente

Las cirugías se realizaron bajo anestesia compuesta por 2% de isoflurano en una mezcla de O<sub>2</sub> y aire comprimido (0.2/0.8 L/min). Durante la cirugía, la temperatura corporal se controló con una sonda de temperatura rectal, y se mantuvo a 37 ± 0,5°C usando una manta térmica sobre la cual se coloca al animal. El procedimiento quirúrgico fue una variante del descrito por Chen (Chen et al., 1986). Brevemente, se hace una incisión en la línea media entre el lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Tras una pequeña craneotomía (2 mm) se expone la arteria cerebral media (ACM) izquierda sobre la fisura rinal y se liga de forma permanente (MCAO) con una sutura de 9/0 (Nylon, S&T). Las oclusiones se realizaron por debajo de la bifurcación proximal (a lo que llamaremos oclusión proximal) o en la rama distal posterior (a lo que llamaremos oclusión distal), según el caso (Figura 3.1 a y b). La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (WILD M650). Los ratones en los que se expuso la ACM pero no se ocluyó fueron utilizados como controles sham. Después de la cirugía, los ratones fueron devueltos a sus jaulas con libre acceso a comida y agua.



**Figura 3.1. Modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media. (A)** Disposición de las ramas anterior y posterior de la ACM. **(B)** Lugar de la oclusión proximal de la ACM.

### 3.1.3. Grupos experimentales

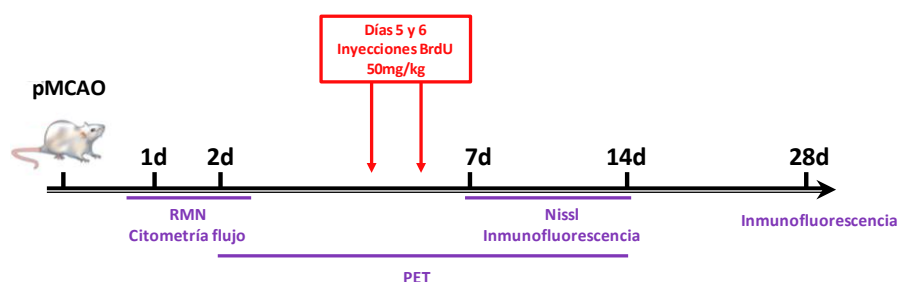
Todos los grupos se hicieron y cuantificaron de forma aleatoria por investigadores que desconocían qué animales componían cada grupo (Tabla 4). Todos los experimentos constarán de grupos de animales isquémicos (MCAO) y de controles sham.

JÓVENES (2-4 MESES)	VIEJOS (12-14 MESES)
Naive TLR4 <sup>+/+</sup>	Naive TLR4 <sup>+/+</sup>
Naive TLR4 <sup>+/+</sup>	Naive TLR4 <sup>+/+</sup>
Sham TLR4 <sup>+/+</sup>	Sham TLR4 <sup>+/+</sup>
Sham TLR4 <sup>-/-</sup>	Sham TLR4 <sup>-/-</sup>
MCAO proximal TLR4 <sup>+/+</sup>	MCAO proximal TLR4 <sup>+/+</sup>
MCAO distal TLR4 <sup>+/+</sup>	MCAO distal TLR4 <sup>+/+</sup>
MCAO proximal TLR4 <sup>-/-</sup>	MCAO proximal TLR4 <sup>-/-</sup>

**Tabla 4. Grupos experimentales.** Cuadro representativo de los grupos de animales utilizados a lo largo de la tesis. Todos los ratones pertenecen a la cepa C57BL. Naive: ratones que no han sido sometidos a ningún tipo de intervención quirúrgica; sham: ratones que han sido sometidos a la intervención quirúrgica pero no se les ha ocluido la ACM. MCAO: ratones a los que se les ha ocluido la ACM, es decir, los ratones isquémicos.

### 3.1.4. Diseño experimental y protocolo de inyecciones de BrdU

En todos los grupos se realizó el mismo protocolo de inyecciones dependiendo del momento de sacrificio. Así, los ratones para los experimentos de inmunofluorescencia fueron inyectados los días 5 y 6 post-isquemia con una sola dosis de 50 mg/kg de 5-bromo-2–deoxiuridina (BrdU) (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Diseño experimental.** Los experimentos se llevaron a cabo, los días 1, 2, 7, 14 y 28 post-isquemia dependiendo de los grupos experimentales y del tipo de ensayo a realizar. Las inyecciones de BrdU sólo se llevaron a cabo en los grupos que iban a ser sacrificados a los 7, 14 y 28 días.

## 3.2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

### 3.2.1. Preparación de muestras común para todos los ensayos de inmunofluorescencia

Los ratones se sacrificaron mediante una dosis letal de isoflurano y se perfundieron con una solución de lavado a través del ventrículo izquierdo (tampón fosfato 0,1 M), seguido de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M. Se extrajo el cerebro y se prosiguió la post-fijación durante 24 horas a 4°C en la misma solución.

Posteriormente, el tejido se mantuvo durante 48 horas en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C para proteger su integridad al congelarlo. Finalmente, se congeló a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para llevar a cabo la inmunohistoquímica, todos los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40µm de grosor con la ayuda de un microtomo de congelación (Leica).

### 3.2.2. Preparación de suspensiones de células de corteza del peri-infarto para citometría de flujo

Para llevar a cabo la caracterización de las poblaciones de células infiltradas en la corteza peri-infarto se utilizaron protocolos modificados de Campanella y colaboradores y de LaFrance-Corey y colaboradores (Campanella et al., 2002; LaFrance-Corey and Howe, 2011) que proporcionan una forma sencilla para aislar una suspensión de los leucocitos cerebrales y caracterizarlos por citometría de flujo. Este protocolo nos permite diferenciar entre microglía ( $CD45^{interm}CD11b^{+}$ ) y células mieloides infiltradas ( $CD45^{hi}CD11b^{+}$ ) basándose en los niveles de expresión diferentes de CD45 (Campanella et al., 2002; Perego et al., 2011).

Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de isoflurano, extrajimos la corteza ipsilateral entera (donde quedará incluida toda la zona dañada y el peri-infarto) y, tras homogenizar el tejido, lo centrifugamos con un gradiente de Percoll. A continuación eliminamos los restos de mielina y pasamos los leucocitos por un filtro de 40 µm de poro tras lo cual realizamos dos lavados de las células centrifugando la suspensión y eliminando el sobrenadante y, procedimos a marcar las células incubándolas 45 minutos con la mezcla de anticuerpos correspondiente (Tabla 5), bloqueando previamente el fragmento Fc (FcR Blocking reagent, Miltenyi).

ANTICUERPO	Casa comercial	Concentración	Técnica	Tejido
FITC anti-CD11b	Miltenyi Biotec	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
FITC Isotípico IgG2b	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
PE anti-Ly6C	Miltenyi Biotec	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
PE Isotípico IgG2a	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
PerCP anti-mouse CD45	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	Corteza
PerCP Isotípico IgG2b	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	Corteza
APC anti-mouse Gr1	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
APC Isotípico IgG2b	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	Sangre/Corteza
PerCP anti-CD3	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	Sangre
PerCP Isotípico IgG2b	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	Sangre
APC anti-prominin1	Miltenyi Biotec	1:100	Citometría de flujo	ZSV
APC Isotípico IgG1	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	ZSV
Anti-mouse EGFR FITC	Invitrogen	1:100	Citometría de flujo	ZSV
FITC Isotípico IgG2b	Biolegend	1:100	Citometría de flujo	ZSV
PE anti-Nestin	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	ZSV
PE Isotípico IgG2a	R&D Systems	1:100	Citometría de flujo	ZSV

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para los experimentos de citometría de flujo.

### 3.2.3. Preparación de suspensiones de células de la zona subventricular (SVZ) para citometría de flujo

El aislamiento de las células progenitoras de origen neural se llevó a cabo utilizando un kit de disociación enzimática basado en papaína, “Neural

tissue dissociation kit” (Miltenyi Biotec), y la disociación mecánica se realizó mediante el “GentleMACS dissociator” (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial (Miltenyi Biotec) (Kaiser et al., 2013). Mediante este procedimiento se obtiene una suspensión de células individualizadas a partir de homogenados de tejido. El procedimiento fue el siguiente: sacrificamos a los animales, aislamos la zona subventricular (SVZ) ipsilateral y la ponemos en un eppendorf con 1mL de PBS frío. Posteriormente el tejido se somete a varias rondas de disgregación mecánica y enzimática con la solución de papaína. Finalmente obtenemos una suspensión celular que marcamos incubando 45 minutos con los anticuerpos de interés y con sus correspondientes controles isotópicos (Tabla 5). Posteriormente fijamos y permeabilizamos la suspensión celular para poder marcar intracelularmente (BD Cytofix/Cytoperm Kit, BD Biosciences). Se incuban 30 minutos las muestras con los anticuerpos intracelulares y con sus controles isotópicos correspondientes a 4°C y protegidas de la luz. Finalmente, se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en 200µl de FACS-Flow (BD Bioscience).

#### **3.2.4. Extracción de sangre y preparación de muestra para citometría**

Para determinar la respuesta celular periférica tras la isquemia cerebral se diseñó un experimento de citometría de flujo para medir los cambios en las poblaciones celulares de interés (Sunderkötter et al., 2004; Cuartero et al., 2013). Todos los grupos de animales descritos en el diseño experimental fueron sacrificados 1 y 2 días tras la isquemia. Se les extrajeron 200 µL de sangre por punción cardíaca con una jeringa heparinizada, se mezclaron con 20 µL de heparina (10%) en un eppendorf y se reservaron a 4°C y protegidos de la luz hasta el momento del experimento. Posteriormente se procedió a hacer la lisis de glóbulos rojos añadiendo tampón de lisis (16,6 gr de cloruro amónico, 2 gr de bicarbonato sódico y 0.074 gr de EDTA en 1 litro de agua) durante 3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron las muestras 5 minutos a 1500 rpm y 4°C y se descartó el sobrenadante por aspiración. Después se hizo un lavado con 4 mL de PBS 1X frío y se centrifugó de nuevo 5 minutos a 1500rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración y se resuspendió el precipitado en 100µL de PBS-BSA 1% con bloqueante del fragmento Fc (2µL/muestra) (FcR Blocking reagent, Miltenyi).

Bloqueamos 15 minutos y después añadimos otros 100µL de la mezcla de anticuerpos (Tabla 5) que habíamos preparado previamente. Incubamos 45 minutos a 4°C y protegido de la luz. Finalmente, se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en 200µl de FACS-Flow (BD Bioscience).

### 3.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### 3.3.1. Evaluación del daño isquémico

##### **Determinación del volumen de infarto por resonancia magnética**

Las resonancias magnéticas se llevaron a cabo a las 24 o 48 horas (según el experimento) tras la oclusión de la ACM usando BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany) con un campo de 4,7 teslas que permite la obtención de imágenes por resonancia magnética *in vivo* y que, junto con el software de imagen ParaVision, permiten la adquisición y reconstrucción de imágenes y el procesado de los datos obtenidos. Una vez adquiridas las imágenes, nos servimos del software ImageJ 1,33u (NIH, Bethesda, MD), para determinar los volúmenes de hemisferio infartado en los distintos grupos a partir de las imágenes en T2.

Con un observador “ciego” a las condiciones experimentales, se calcularon las áreas de tejido infartado (InfArea), el hemisferio ipsilateral entero (IpsArea) y el hemisferio contralateral entero (ContrArea) para cada sección. Después, se calcula el porcentaje de hemisferio infartado (%HI) como ya se hizo previamente (Hernández-Jiménez et al., 2013) usando la fórmula:  $\%HI = \frac{\sum InfArea_i}{\sum ContrArea_i} \times 100$  donde InfVol (Volumen de tejido infartado) =  $\sum InfArea_i / \text{Índice de edema}_i$ , ContrVol (Volumen de hemisferio contralateral) =  $\sum ContrArea_i / \text{Índice de edema}_i$ .

Para dichas medidas empleamos 15 secciones separados 391 micras entre sí desde bregma 2,5 mm a bregma -2,7 mm. La conversión de las medidas obtenidas con el MRI *analysis calculator* a unidades de volumen (mm<sup>3</sup>) para su introducción en la fórmula de % Hemisferio Infartado se consiguió aplicando las siguientes formulas:

$$\text{Resolución en el Plano} = \text{Vol MRI analysis calculator} \times 0,098 \times 0,098$$

$$\text{Resolución en Volumen} = \text{Resolución Plano} \times 0,391$$

*Volumen Infarto = Suma de volúmenes*

### **Determinación del volumen de infarto por tinción de Nissl**

Además, el volumen de infarto se determinó mediante la tinción histológica de Nissl, para la que se utilizaron 7 secciones. Para obtenerlos, los animales con oclusión de la ACM fueron sacrificados a los 7 y 14 días. Después se montaron 12 secciones histológicas, separadas entre sí 480 micras (desde bregma 2,5mm a -3,2mm) sobre un portaobjetos *Superfrost* (Thermo Scientific) y se secaron. Después se hidrataron con agua destilada y se sumergieron en una solución con 0,1% de violeta de cresilo (Sigma Aldrich) en presencia de ácido acético glacial durante 1,5 minutos para teñirlas. Después, las muestras fueron deshidratadas sometiéndolas a una gradación creciente de alcohol:

- Inmersión en 70% etanol: 30 segundos
- Inmersión en 90% etanol: 30 segundos
- Inmersión en 100% etanol: 1 minuto
- Inmersión en *Histoclear*: 2 minutos
- Aplicación de medio de montaje DPX (Sigma Aldrich) y el cubreobjetos.

La tinción de Nissl permite visualizar el infarto como un área hipocromática en la corteza ipsilateral, indicando el daño neuronal. Para realizar la medida del volumen del infarto, se utilizó el método de Cavalieri (Michel and Cruz-Orive, 1988) utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation), por medio del software Stereoinvestigator 6 (MicroBrightfield Inc.). Esta prueba permite realizar una estimación de un área o volumen superponiendo una serie de puntos sobre el área de interés y realizando un conteo del número de puntos que se encuentran (equidistantes) dentro del área seleccionada. Así, para cuantificar el volumen del infarto, se realizaron medidas del hemisferio sano (Hc) y lesionado (Hi) excluyendo la lesión, y de esta manera se hace la corrección del edema. La estimación de los volúmenes se realizó con un coeficiente de error medio menor de 0,05 (Gundersen,  $m=0,01$ ). Posteriormente se determinó el porcentaje de hemisferio infartado (PHI) usando la siguiente fórmula:  $PHI\%=(1-(Hi/Hc))*100$ .



### 3.3.2. Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia se tomaron secciones equidistantes desde el comienzo de los ventrículos laterales (1,70mm de bregma, según “*The mouse brain stereotaxic coordinates*” (Paxinos and Franklin, 2001), separadas distancias concretas en función del ensayo. Una vez elegidas las secciones a utilizar para la tinción por inmunofluorescencia, éstas se lavan 3 veces en KPBS y, posteriormente, en el caso de los ensayos con BrdU, se incuban 30 minutos a 37°C en HCl 2N para desnaturalizar el ADN y exponerlo para que pueda unirse la BrdU. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los distintos anticuerpos primarios (Tabla 6) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces en 0,25% Triton-KPBS y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios durante dos horas a temperatura ambiente y oscuridad. Cuando se finalizó la tinción, los cortes se montaron en portas y se codificaron para la cuantificación.

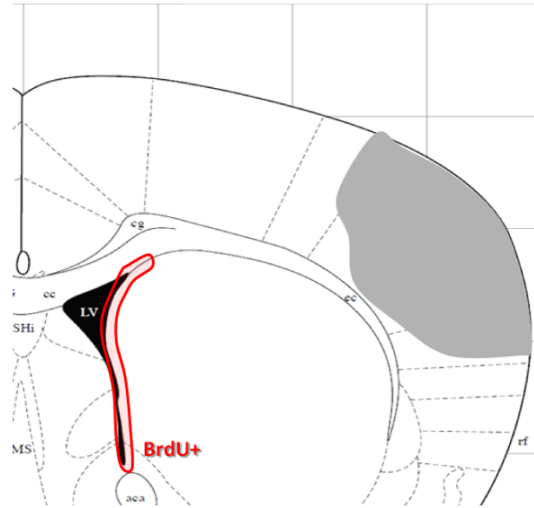
ANTICUERPO	Casa comercial	Concentración	Técnica	Zona Tejido
Rat anti-BrdU	AbD Serotec	1:200	Inmunofluorescencia	Corteza/SVZ
Cy3 anti-rat	Millipore	1:200	Inmunofluorescencia	Corteza/SVZ
Goat anti-Doublecortin	Santa Cruz	1:400	Inmunofluorescencia	SVZ
Biotinilado anti-goat	Vector	1:400	Inmunofluorescencia	SVZ
Rabbit anti-Iba1	Wako	1:500	Inmunofluorescencia	Corteza/CC
Biotinilado anti-rabbit	Vector	1:400	Inmunofluorescencia	Corteza
Mouse anti NeuN	Millipore	1:400	Inmunofluorescencia	Corteza
Biotinilado anti-mouse	Vector	1:400	Inmunofluorescencia	Corteza
Alexa 488 Streptavidina	Invitrogen	1:500	Inmunofluorescencia	Corteza/SVZ

Tabla 6: Anticuerpos utilizados para los experimentos de inmunofluorescencia

#### - Cuantificación de células en la zona subventricular por estereología

El volumen total de la extensión dorsolateral estriatal de la SVZ se estimó mediante el principio de Cavalieri en 6 secciones por cerebro separadas entre sí 0,320 mm (desde 1,70 mm de Bregma a -0.54 mm de Bregma) y con

un grosor de 40  $\mu\text{m}$  cada sección. Para llevar a cabo la cuantificación, tomamos como punto inicial la sección en que aparecen los ventrículos laterales por primera vez desde la parte más rostral. El criterio morfológico que utilizamos para delinear la zona de interés (SVZ) fue descrita anteriormente (Gonzalez et al., 2007) (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Esquema representativo de la zona analizada.** El esquema representa la zona de cuantificada por cavalieri y dentro del cual se llevó a cabo la cuantificación

La estimación estereológica del número total de células BrdU+ en la extensión dorsolateral de la SVZ se determinó usando el método del fraccionador óptico, que permite realizar una estimación del número total de células presentes en una estructura determinada (Gundersen et al., 1988). Los parámetros específicos usados para el muestreo estereológico y la cuantificación de células BrdU+ están resumidos en la tabla 7.

JÓVENES						
Parametros	Grupo 7 días			Grupo 14 días		
	NT	NR	JT	NT	NR	JT
Campo de contaje	100 (10x10)			100 (10x10)		
Sitios de muestreo por cerebro (media±SD)	495±32	494±121	511±69	369±39	364±77	335±48
Total de células BrdU+ contadas(media±SD)	346±41	262±134	313±64	117±35	162±86	136±41
CE (Gundersen, m=0) (media±SD)	0,11±0,03	0,13±0,03	0,12±0,02	0,12±0,03	0,12±0,02	0,12±0,02

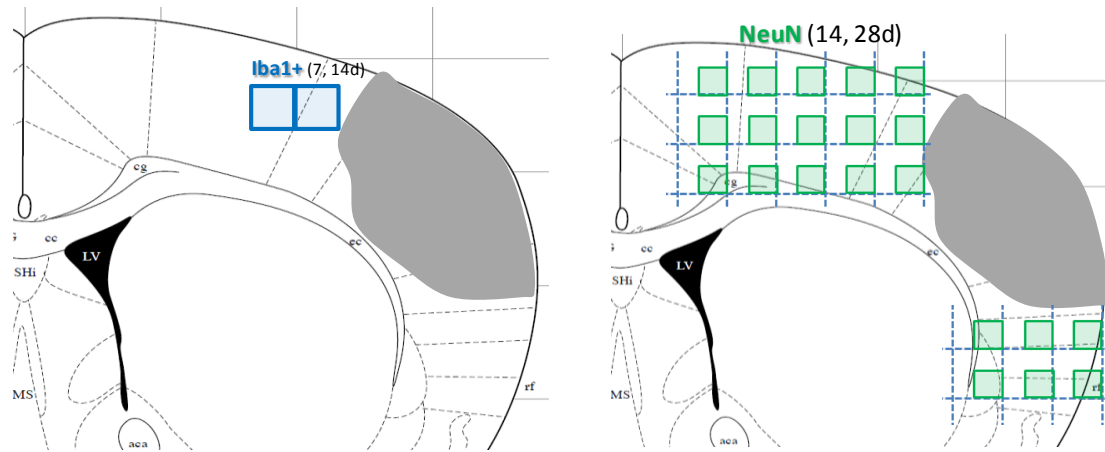
VIEJOS						
Parametros	Grupo 7 días			Grupo 14 días		
	NT	NR	JT	NT	NR	JT
Campo de contaje	100 (10x10)			100 (10x10)		
Sitios de muestreo por cerebro (media±SD)	632±192	451±94	521±92	327±51	368±68	254±14
Total de células BrdU+ contadas(media±SD)	370±64	401±140	392±42	227±43	273±39	155±5
CE (Gundersen, m=0) (media±SD)	0,1±0,03	0,1±0,04	0,11±0,02	0,11±0,01	0,1±0,02	0,12±0,01

Tabla 7. Parámetros utilizados para la cuantificación estereológica de células BrdU+ en la ZSV.

### - Contaje de células Iba1+, BrdU+ y NeuN en corteza mediante imágenes por microscopía confocal

Para el estudio de las células BrdU+ y BrdU+/Iba1+, éstas se cuantificaron mediante imágenes confocales digitalizadas capturadas de 6 secciones de 40 µm, separadas entre sí 0,32 mm utilizando el software ZEN 2009 (Carl Zeiss Microimaging GmbH). El criterio para la cuantificación consistió en medir 200 µm desde el borde del infarto (células microgliales con morfología ameboide) y desde la corteza, y tomar cuatro imágenes por sección, dos en la corteza ipsilateral y dos en la contralateral de 200 x 200 µm con el microscopio confocal (Zeiss LSM 710) tal como se indica en la imagen. Las colocalizaciones tridimensionales de los dos marcadores se validaron con *z-stacks*.

Para el contaje de las células BrdU+ y BrdU+/NeuN+ se tomaron imágenes confocales de 5 secciones equidistantes partiendo de 1,7mm de bregma. De cada una de las secciones se tomaron imágenes a 40X y separadas entre sí 400µm hasta que rastreamos toda la parte superior de la corteza y 800 µm por debajo del infarto, utilizando como límites el cuerpo calloso, el final de la corteza y analizando un total de unas 18-20 imágenes por hemisferio y sección (Figura 3.4).

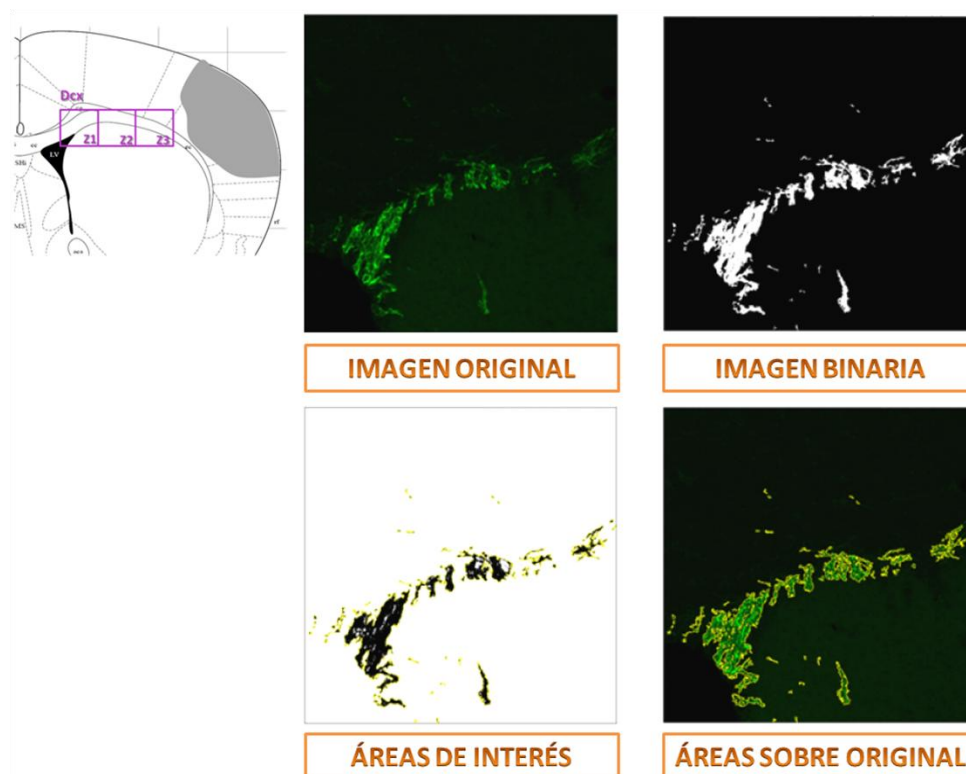


**Figura 3.4.** Esquema representativo de la zona analizada para el estudios de la proliferación microglial en la corteza (Iba1, recuadros azules) o neuronal (NeuN recuadros verdes)

**- Densitometría en zona subventricular y cuerpo calloso (ruta migratoria de neuroblastos Dcx+ y de microglía Iba1+) mediante imágenes por microscopía confocal**

Para el estudio de las células doblecortina positivas (**Dcx+**) y su distribución espacial, se tomaron imágenes de cuatro secciones correlacionadas (separadas entre sí 0,32mm). Se hicieron *z-stacks* a 20X de la zona subventricular (Z1 de Figura 3.5). Y, a partir de ahí, se tomaron otras dos imágenes contiguas a lo largo del cuerpo calloso hacia la corteza de ese lado del hemisferio (Z2 y Z3). Una vez obtenidas todas las imágenes, las analizamos por densitometría con el programa ImageJ v-1-44I (NIH, Bethesda, MD). En resumen, el procedimiento que seguimos es el que se describe a continuación (Zarruk et al., 2012):

- Convertimos la proyección máxima de las imágenes originales en binaria.
- Calculamos el área ocupada por las células Dcx positivas.
- Eliminamos el fondo fuera de nuestras áreas de interés y llevamos el contorno del área a nuestra imagen original.
- Calculamos la intensidad de marcaje mediante la densidad integrada de las áreas de interés. La densidad integrada es el cálculo de la media de área teñida y de la intensidad de marcaje en cada pixel de esa área, e indica la cantidad total de células teñidas en esa área.



**Figura 3.5.** Esquema representativo de los neuroblastos en las zonas migratorias analizadas (Dcx+, recuadros púrpuras). Ejemplo del tratamiento efectuado sobre las imágenes para densitometrarlas.

Para el estudio de la morfología de las células microgliales **Iba1+** en el cuerpo calloso, se tomaron imágenes en la Z2 de las mismas secciones que en el estudio de los neuroblastos **Dcx+**, y se procedió como se describe a continuación:

- Convertimos la proyección máxima de las imágenes en binaria.
- Acortamos el área de interés al cuerpo calloso
- Calculamos la densidad integrada de la imagen binaria.

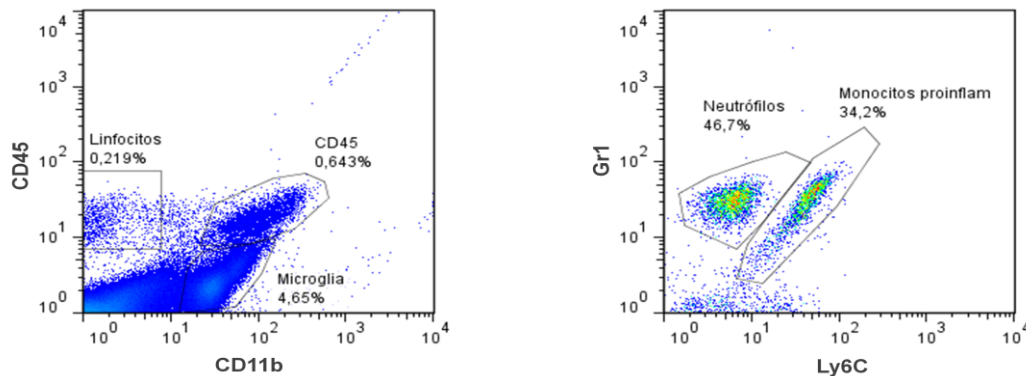
### 3.3.3. Análisis por citometría de flujo

Para la adquisición de datos usamos un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson S.A.) y el software BD Cellquest™ PRO. Los parámetros de adquisición se definieron en función del tamaño y la complejidad celular de las poblaciones analizadas por citometría. El análisis de datos se llevo a cabo empleando el programa FlowJO (Tree Star inc.)

### Análisis de la corteza cerebral ipsilateral

A partir del dot plot de tamaño y complejidad de la muestra, delimitamos una región leucocitaria R1 compuesta por la fracción de polimorfonucleados y mononucleados de la sangre, de la cual se adquirieron todos los eventos celulares en cada muestra.

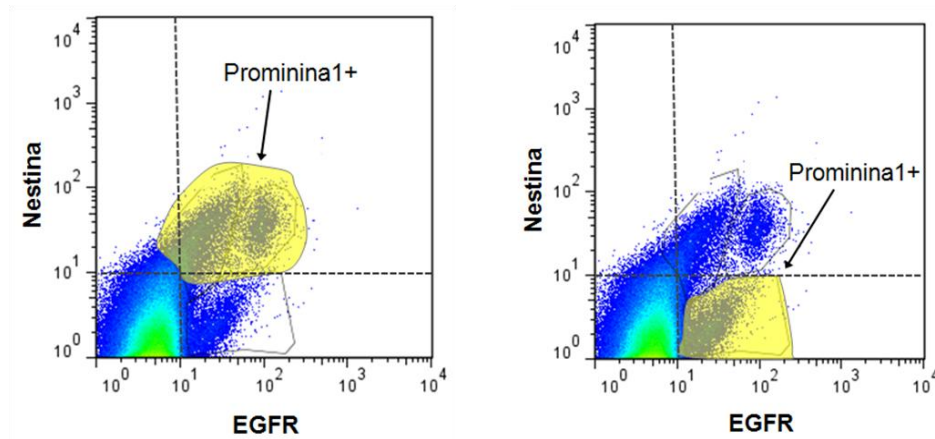
La determinación de las diferentes poblaciones leucocitarias se llevó a cabo de la siguiente forma (Campanella et al., 2002): el porcentaje de linfocitos se definió como el total de células CD11b-CD45<sup>hi</sup> situadas en la región mononuclear (SSC<sup>low</sup>). El porcentaje de microglía se definió como el número total de células CD11b+CD45<sup>-</sup> SSC<sup>low</sup> (Figura 3.6) y con un marcaje variable para Gr1. Respecto a los infiltrados, estas células se definieron como CD11b+CD45<sup>hi</sup> SSC<sup>high</sup>. De esta población, los Gr1+Ly6C<sup>lo</sup> representan a los neutrófilos, y los Gr1+Ly6C<sup>+</sup> son los monocitos pro-inflamatorios. La intensidad de fluorescencia considerada como positiva se definió respecto al empleo de controles isotópicos para cada uno de los marcadores estudiados.



**Figura 3.6.** Diagramas de puntos representativos con las regiones que contienen las poblaciones de interés en la corteza cerebral.

### Análisis de la zona subventricular

Para determinar las distintas poblaciones de interés, nos basamos en los criterios de clasificación de Kempermann (Kempermann et al., 2004) según los cuales, las poblaciones Prominina1+/EGFR+/Nestina+ (Figura 3.7) serían o células madre (tipo B) o células progenitoras tempranas altamente proliferativas (tipo 2a y 2b); y la población Prominina1+/EGFR+/Nestina- serían progenitores más tardíos que aún mantienen capacidad proliferativa pero que han perdido el marcaje de nestina (Figura 3.7).



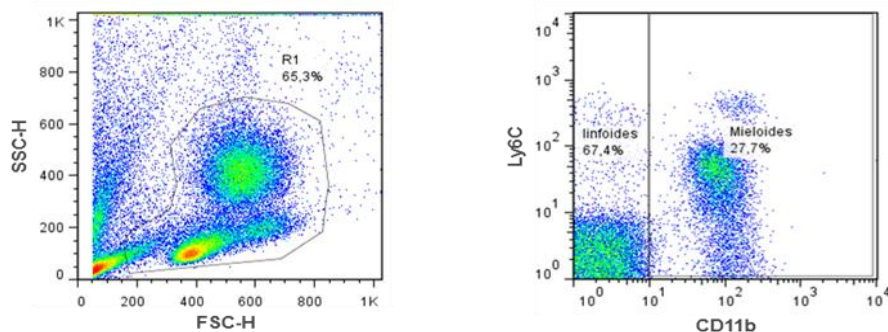
**Figura 3.7.** Diagramas de puntos representativos con las regiones que contienen las poblaciones de interés en la zona subventricular.

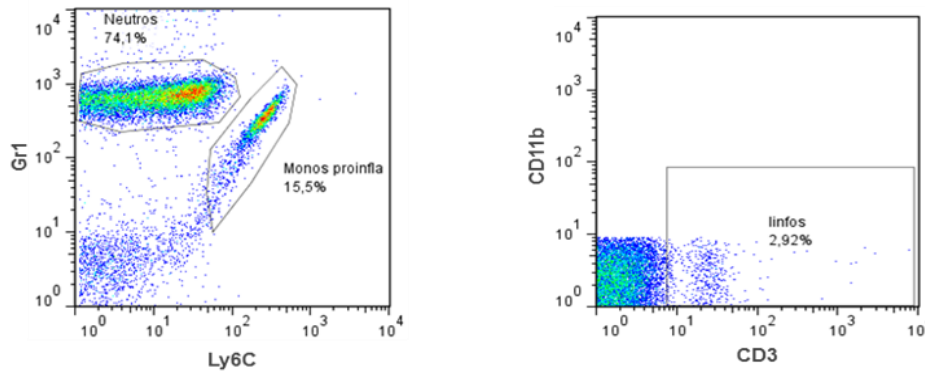
### **Análisis de la sangre periférica**

Al igual que en el resto de experimentos, una vez seleccionada la región R1 que contendrá las poblaciones de interés, pasamos la totalidad de la muestra por el citómetro. Las poblaciones que son interesan vendrán definidas por los siguientes marcadores (Slaney et al., 2011):

- CD11b<sup>+</sup>Ly6C: Linaje mieloide
  - Ly6C<sup>lo</sup>Gr1+: Neutrófilos
  - Ly6C<sup>hi</sup>Gr1+: Monocitos
- CD11b<sup>-</sup>Ly6C+: Linaje linfoide
  - CD3+: Linfocitos

Y se distribuyeron como se muestra en los dot plot (Figura 3.8).



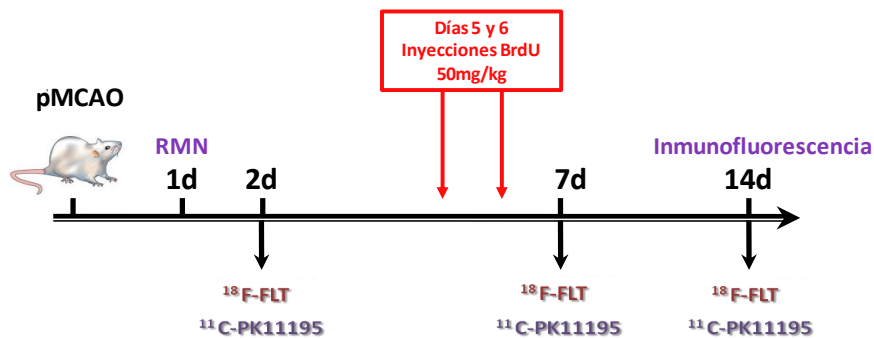


**Figura 3.8.** Diagramas de puntos representativos con las regiones que contienen las poblaciones de interés en la sangre. El diagrama superior de la izquierda, muestra la distribución típica de las poblaciones sanguíneas según su tamaño y complejidad. A la derecha se dividen en estirpe mieloide o linfoide en función del marcaje de CD11b. En los diagramas inferiores, se muestran las tres poblaciones de interés con sus marcajes específicos.

### 3.3.4. Estudio por neuroimagen de inflamación y proliferación

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica no invasiva de diagnóstico de medicina nuclear que proporciona datos de interés patológico *in vivo*. En el contexto de ictus, PET se ha utilizado para evaluar el consumo de glucosa, oxígeno, flujo sanguíneo cerebral y el volumen sanguíneo cerebral (Phelps et al., 1979; Young et al., 1999)

El principio de la técnica se basa en la administración intravenosa de compuestos marcados con radioisótopos que emiten positrones de vida corta, para obtener imágenes tridimensionales de procesos funcionales en animales y/o humanos.



**Figura 3.9.** Diseño experimental. Los experimentos de tomografía se llevaron a cabo, los días 2, 7, y 14, momento en el que se realizaron las inyecciones de los radiotrazadores.

Para el estudio de los procesos inflamatorios se utiliza la isoquinolina carboxamida, PK11195, que es un ligando no benzodiazepínico que se une



específicamente a PBR/TSPO, una proteína que se sobre-expresa en la membrana externa mitocondrial de la microglía activada. En el cerebro sano, la expresión de TSPO es mínima, lo que hace que TSPO pueda servir como biomarcador de inflamación (Chen and Guilarte, 2008).

El radiotrazador que se utiliza más ampliamente en tomografía por emisión de positrones (PET) es [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195. La interpretación de los resultados se limita principalmente a un acuerdo entre las zonas de mayor absorción de PK11195 y la distribución conocida de una patología dada. El radiotrazador fue administrado a los animales los días 2, 7 y 14 tras la isquemia (Figura 3.9).

Para el estudio de la neurogénesis se utiliza FLT, que es un análogo de la timidina. Para estudiar la tasa de proliferación celular se usa el radiotrazador [ $^{18}\text{F}$ ] FLT. La célula incorpora [ $^{18}\text{F}$ ] FLT tanto a través de transporte facilitado dependiente de sodio ( $\text{Na}^+$ ) como por difusión pasiva. Una vez dentro de la célula, [ $^{18}\text{F}$ ] FLT se fosforila por timidina quinasa (TK1), lo cual provoca que quede atrapado dentro de la célula. La actividad enzimática de TK1 está prácticamente ausente en las células quiescentes, pero en las proliferativas alcanza máximos al final de la fase G1 y en la fase S del ciclo celular. Por lo tanto, la fosforilación por TK1 forma la base de [ $^{18}\text{F}$ ] FLT como trazador de proliferación. El radiotrazador se administró a los animales los días 2, 7 y 14 (Figura 3.9).

### **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se analizaron utilizando el programa PRISM 5 (GraphPad Software Inc.). Se realizó una t de Student para comparar dos grupos y una ANOVA de una sola vía seguido de una prueba post-hoc de Neuman-Keuls para comparar más de dos grupos. Las comparaciones entre variables independientes no paramétricas se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney. La asociación lineal entre dos variables se determinó por el coeficiente de correlación de Pearson. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (ESM) y una  $p < 0,05$  se asumió como estadísticamente significativa.

# RESULTADOS



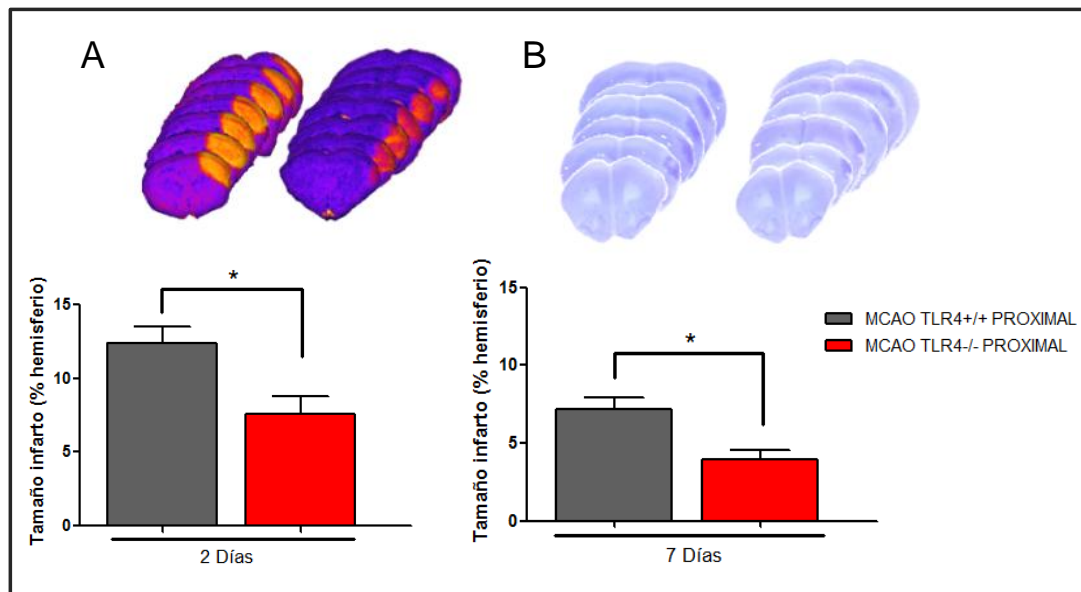


## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio del efecto del receptor TLR4 en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental

#### 4.1.1. Efecto de TLR4 en el tamaño del infarto cerebral

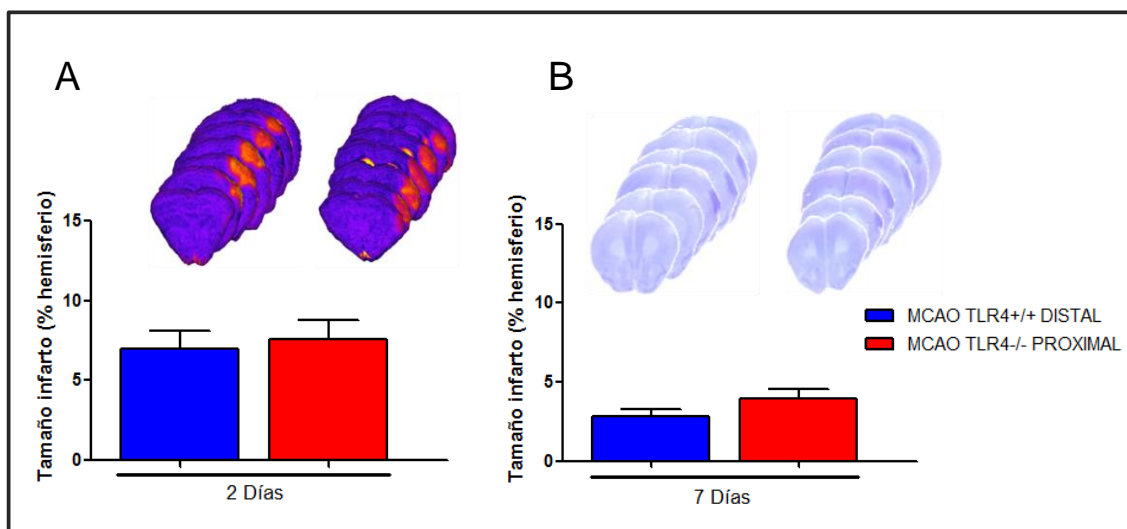
La oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) se realizó en ratones jóvenes de la cepa C57BL/10ScNJ (TLR4<sup>-/-</sup>), los cuales carecen de expresión del receptor TLR4, y ratones jóvenes de C57BL/10J (TLR4<sup>+/+</sup>), que expresan de forma normal TLR4. Los ratones TLR4<sup>-/-</sup> tras MCAO tuvieron infartos significativamente más pequeños a los 2 días de la isquemia comparado con los ratones normales (TLR4<sup>+/+</sup>) (Figura 1,  $p < 0,05$ ), como ya se había descrito previamente en nuestro grupo (Caso et al., 2007). El tamaño de infarto también se midió a los 7 días de la MCAO por tinción de Nissl manteniéndose la reducción observada a los 2 días (Figura 4.1).



**Figura 4.1. Efecto de TLR4 en el tamaño de infarto.** En la parte superior vemos un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas por RMN (2 días) o por tinción de Nissl (7 días). **(A)** Representación gráfica de los tamaños de infarto entre los animales TLR4<sup>+/+</sup> con MCAO proximal (columnas grises; C57BL/10J: TLR4<sup>+/+</sup>) y los ratones TLR4<sup>-/-</sup> con MCAO proximal (columnas rojas; C57BL/10ScNJ: TLR4<sup>-/-</sup>) a los 2 y **(B)** a los 7 días. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $*p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.

Con el fin de estudiar el papel de TLR4 sobre la proliferación celular sin que interfirieran las diferencias en el tamaño de infarto, decidimos realizar la

oclusión en la rama posterior de la arteria cerebral media en los ratones  $TLR4^{+/+}$  (por encima de la bifurcación) en una localización distal. Así, obtuvimos un grupo adicional con tamaños de infarto similares a los de los animales del grupo de  $TLR4^{-/-}$ . De esta manera, comparamos los animales  $TLR4^{-/-}$  ocluidos en el tronco de la ACM (en un punto al que llamaremos oclusión proximal) y los animales  $TLR4^{+/+}$  ocluidos en la rama posterior (que llamaremos oclusión distal) (Figura 4.2), para así evitar el sesgo que las diferencias en el tamaño de infarto producirían para estudios posteriores. Por lo tanto, salvo que se indique lo contrario, a partir de ahora compararemos estos dos grupos.



**Figura 4.2. Efecto de TLR4 en el tamaño de infarto.** En la parte superior vemos un ejemplo representativo de las imágenes obtenidas por RMN (2 días) o por tinción de nissl (7 días). **(A)** Representación gráfica de los tamaños de infarto entre los animales  $TLR4^{+/+}$  con MCAO distal (columnas azules; C57BL/10J:  $TLR4^{+/+}$ ) y los animales  $TLR4^{-/-}$  con MCAO proximal a los 2 y **(B)** a los 7 días. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.

En la representación rostro-caudal del área infartada de los tres grupos experimentales (Figura 4.3), vemos que la parte afectada en el grupo de la oclusión distal es principalmente la parte posterior (al haber sido ocluida la rama posterior). En cambio, en el caso de los ratones deficientes para TLR4 la protección se observa en la parte posterior del área infartado (Figura 4.3).

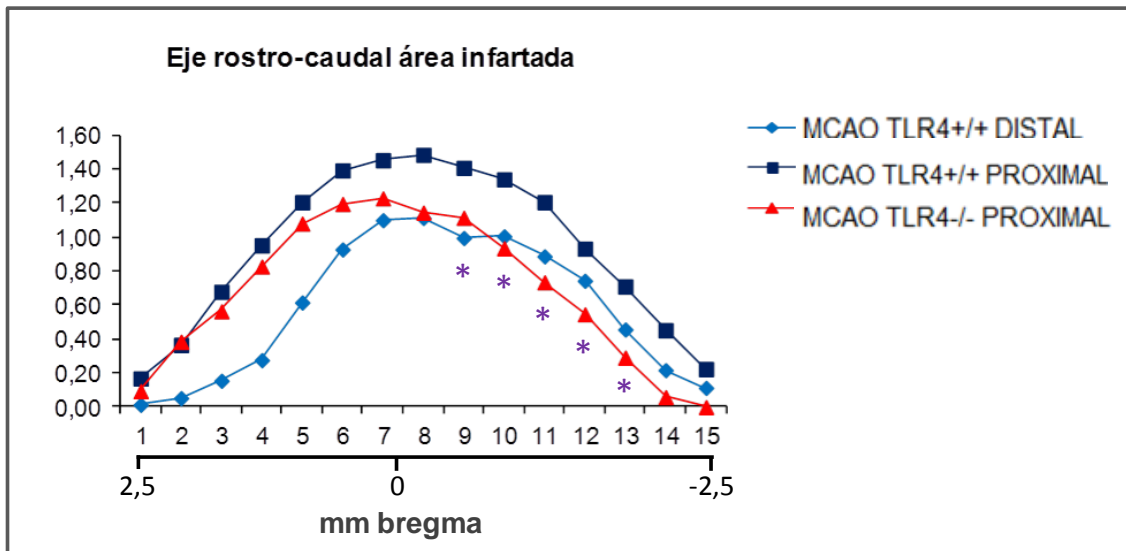
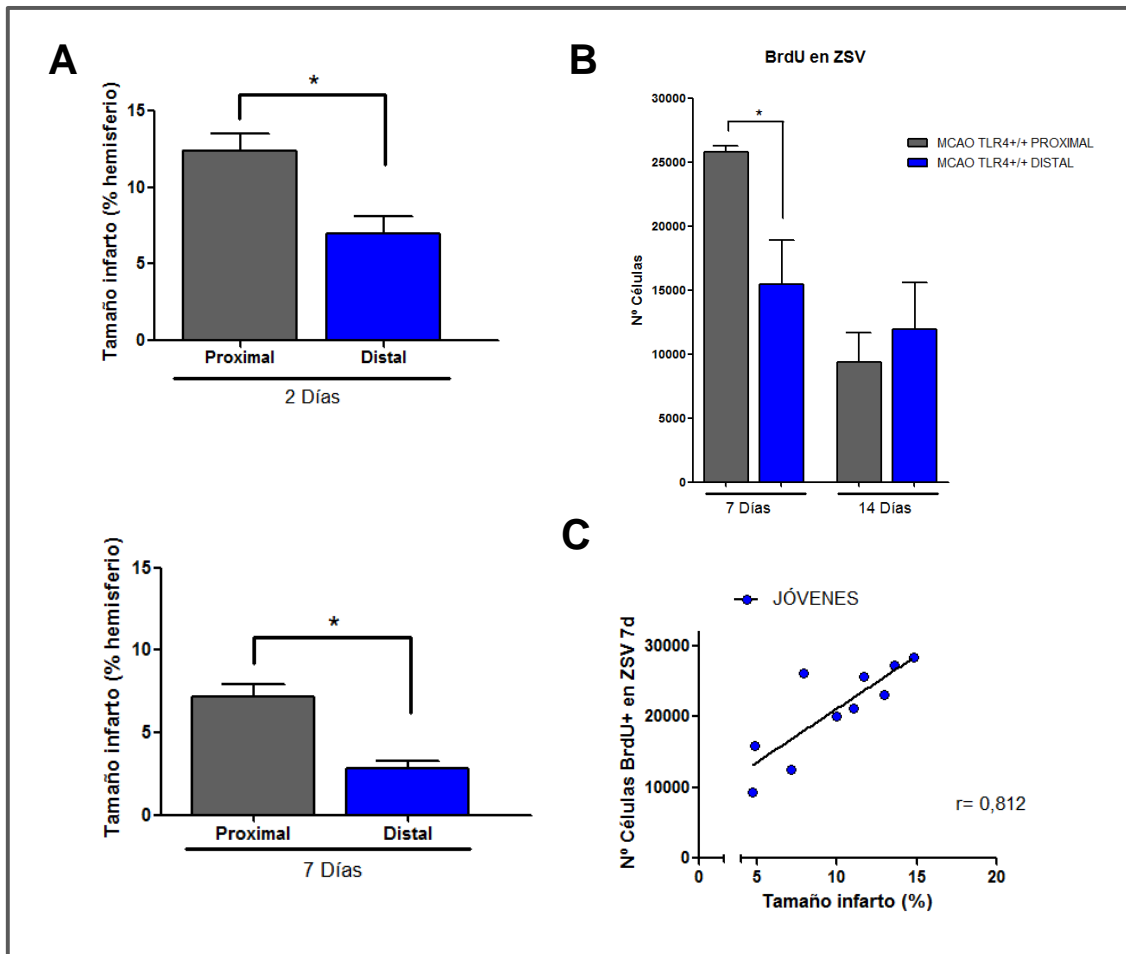


Figura 4.3. Representación rostro-caudal del área infartada en animales jóvenes a los 2 días. Se mide por RMN en 15 secciones equidistantes (desde 2.5 mm de bregma hasta -2.7 mm de bregma). TLR4<sup>+/+</sup> proximal vs. TLR4<sup>-/-</sup> \*  $p < 0,05$

#### 4.1.2. Efecto de TLR4 en la proliferación celular

##### a. Influencia del tamaño del infarto en la proliferación celular

Como cabía esperar, el grupo de animales con oclusión distal tuvo infartos significativamente menores que los grupos de oclusión proximal (Figura 4.4 A;  $p < 0,05$ ). Nuestros resultados mostraron que los animales que habían sido sometidos a oclusión proximal presentaban mayor número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 días que los animales con oclusión distal (Figura 4.4 B; MCAO proximal vs MCAO distal;  $p < 0,05$ ). Observamos así una fuerte correlación positiva entre el tamaño de infarto y la proliferación celular (células BrdU+) determinado en la ZSV ipsilateral a los 7 días post-ictus (Figura 4.4 C;  $r = 0,812$ ,  $n = 10$ ). Sin embargo, esta correlación fue negativa cuando se midió la proliferación 14 días tras ictus ( $r = 0,909$ ,  $n = 10$ . Datos no mostrados), un tiempo al que una alta proporción de células proliferativas podría haber migrado a otras áreas.



**Figura 4.4. Efecto del tamaño de infarto en la proliferación de la ZSV.** (A) Los tamaños de infarto se determinaron por RMN (2 días) y por tinción de Nissl (7 días) tras MCAO en ratones que expresan TLR4 de forma normal (TLR4<sup>+/+</sup>) (oclusión distal o proximal de la ACM, ver Materiales y métodos). Los datos mostrados son la media  $\pm$  EEM, n=6-8, \*p<0,05. (B) Número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 y 14 días tras MCAO en ratones TLR4<sup>+/+</sup>. (C) Correlación entre el número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 días y el tamaño de infarto de los ratones TLR4<sup>+/+</sup> (n=10).

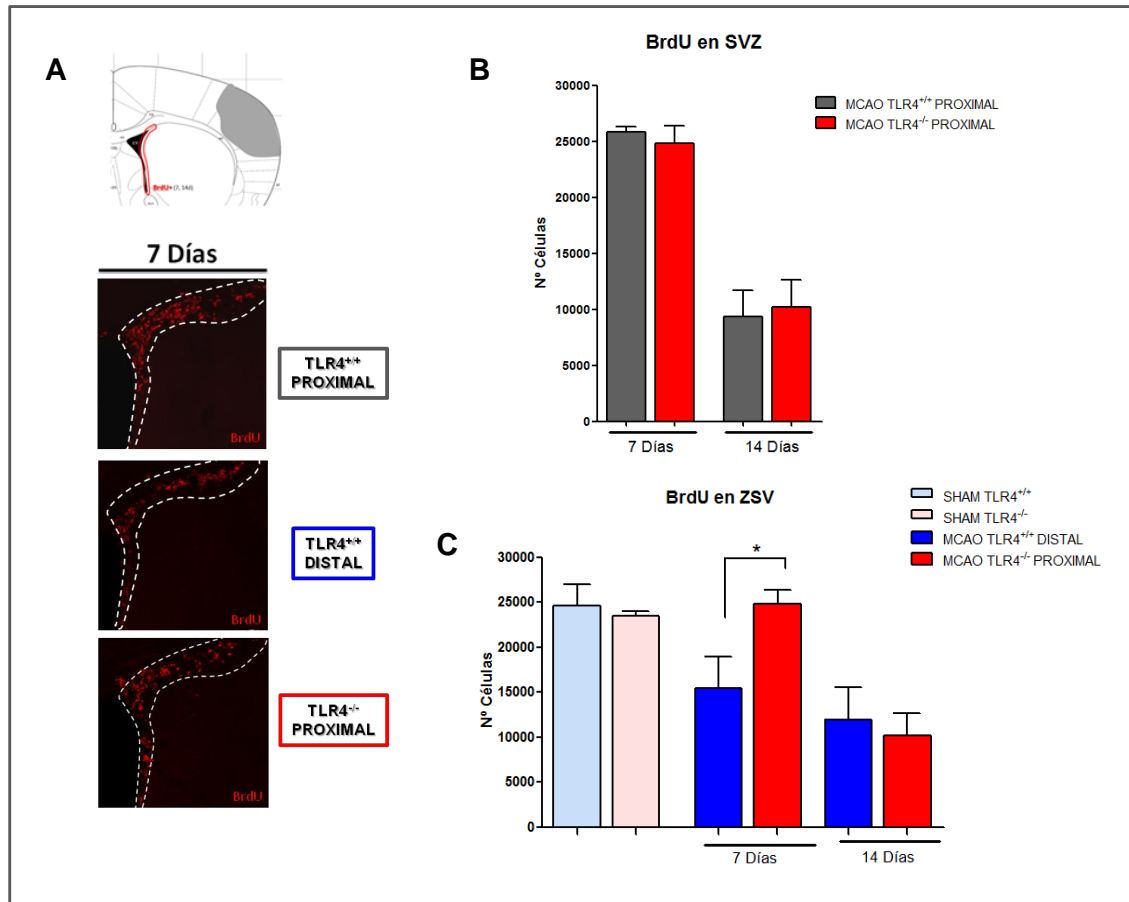
## b. Proliferación celular en la zona subventricular

### - Estudios inmunohistoquímicos

Como ya habíamos comentado previamente, TLR4 inhibe la proliferación bajo condiciones fisiológicas (Rolls et al., 2007). Sin embargo, no había trabajos que estudiaran este proceso tras ictus. Nosotros, no hemos detectado diferencias en el número de células BrdU+ a los 7 y 14 días tras el ictus cuando comparamos TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> (p>0.05; Figura 4.5 A y B). Como antes explicamos, los ratones deficientes para TLR4 tienen menores volúmenes de infarto y, como hemos visto previamente, la proliferación depende del tamaño



de infarto. Por ello quisimos estudiar el efecto de TLR4 en la proliferación celular de la ZSV tras ictus pero sin el sesgo debido al distinto tamaño de infarto. Por ello comparamos el grupo de animales TLR4<sup>+/+</sup> con oclusión distal y el grupo TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal (cuyos infartos son de tamaño similar) observando que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal presentaban mayor número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 días post-ictus que el grupo TLR4<sup>+/+</sup> de oclusión distal (Figura 4.5 A y C;  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.5. Efecto de TLR4 en la proliferación celular en la ZSV tras un ictus.** (A) Imágenes representativas de las células BrdU+ en la ZSV (Barra de escala= 200  $\mu$ m) (B). Número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 y 14 días después de la isquemia, cuando comparamos TLR4<sup>+/+</sup> con MCAO proximal (columnas grises) y TLR4<sup>-/-</sup> con MCAO proximal (columnas rojas) (C) y TLR4<sup>+/+</sup> con oclusión distal frente a TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.

Los valores de proliferación (células BrdU+) en la ZSV en los ratones sham TLR4<sup>+/+</sup> fueron  $24700 \pm 1639$  y  $8390 \pm 350$  y en los sham TLR4<sup>-/-</sup>,  $24035 \pm 728$  y  $10400 \pm 502$ , a los 7 y 14 días, respectivamente.

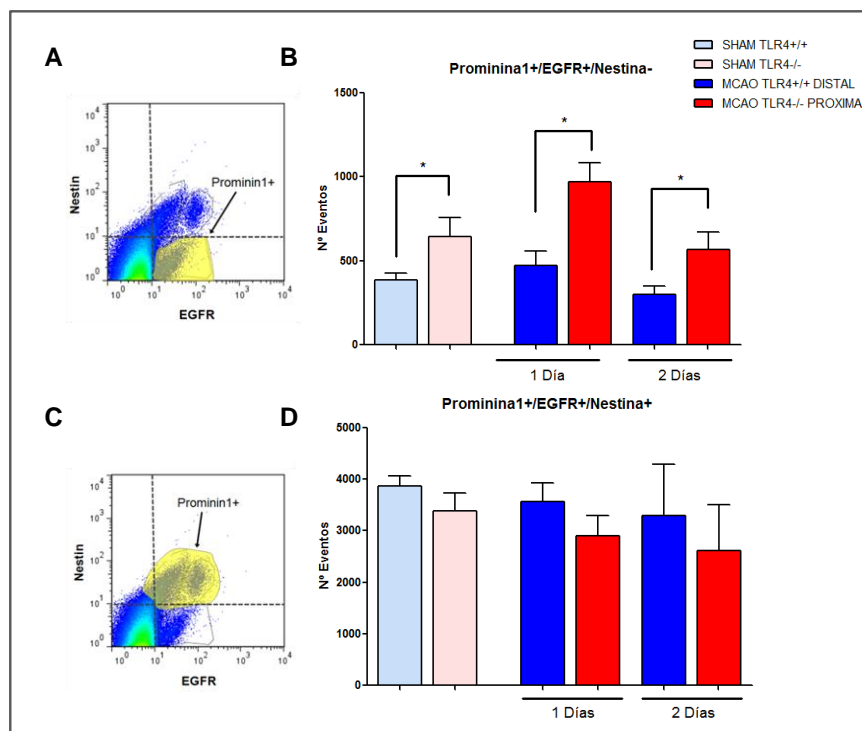


## - Estudios por citometría de flujo

Caracterizamos por citometría de flujo los diferentes tipos celulares presentes en la SVZ 1 y 2 días post-isquemia; el análisis reveló la existencia de dos poblaciones principales con los marcadores que habíamos utilizado:

1. Una población *prominina1+/EGFR+/nestina-*, que se correspondería, al menos en parte, con las células progenitoras de amplificación transitoria (células tipo C; Figura 4.6A y 4.6B).
2. Una población *prominina1+/EGFR+/nestina+*, que se correspondería con la población de células madres neurales (células tipo B; Figura 4.6C y D).

Mientras que en la población *prominina1+/EGFR+/nestina+* no se observaron diferencias entre grupos (Figura 4.6D), vimos que sí las había en la población *prominina1+/EGFR+/nestina-* (Figura 4.6B). Concretamente, encontramos que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> tenían mayor número de células de esta población que los TLR4<sup>+/+</sup> a los días 1 y 2 de la ischemia y, curiosamente, vimos el mismo efecto en los animales sham (Figura 4.6B).

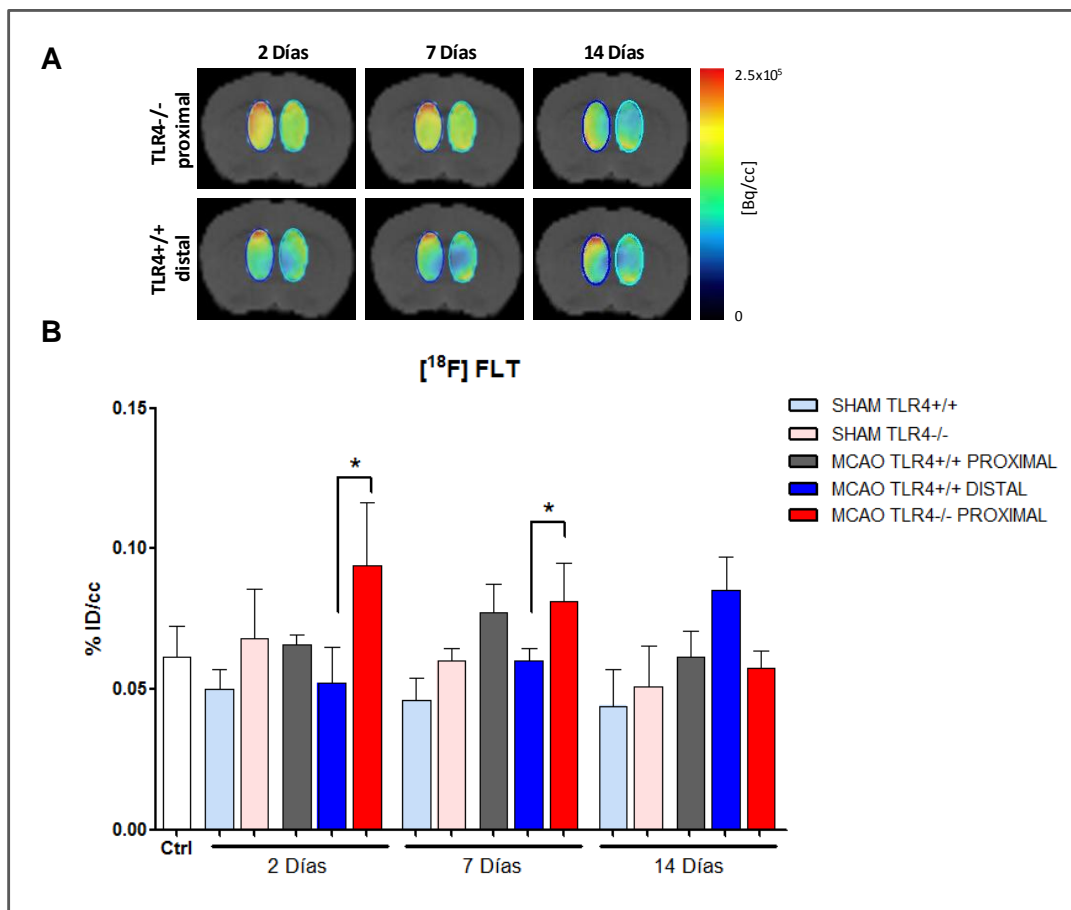


**Figura 4.6. Efecto de TLR4 en la proliferación celular en la ZSV tras un ictus.** Análisis por citometría de flujo de la ZSV para células madre neurales. (A y C) Dot plots representativos del número de células de las poblaciones de interés: *prominina1+/EGFR+/nestina+* y *prominina1+/EGFR+/nestina-*. (B) Gráficas de los datos obtenidos los días 1 y 2 de las poblaciones *Prominina1+/EGFR+/Nestina-* y (D) *Prominina1+/EGFR+/Nestina+*. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.

### - Estudios por PET

Para corroborar nuestros resultados obtenidos por inmunofluorescencia y por citometría de flujo, realizamos estudios por tomografía por emisión de positrones (PET) utilizando el radiotrazador [ $^{18}\text{F}$ ] FLT (descrito en el apartado de *Materiales y métodos*), que fue administrado a los animales los días 2, 7 y 14 tras la isquemia; posteriormente se analizaron las autorradiografías.

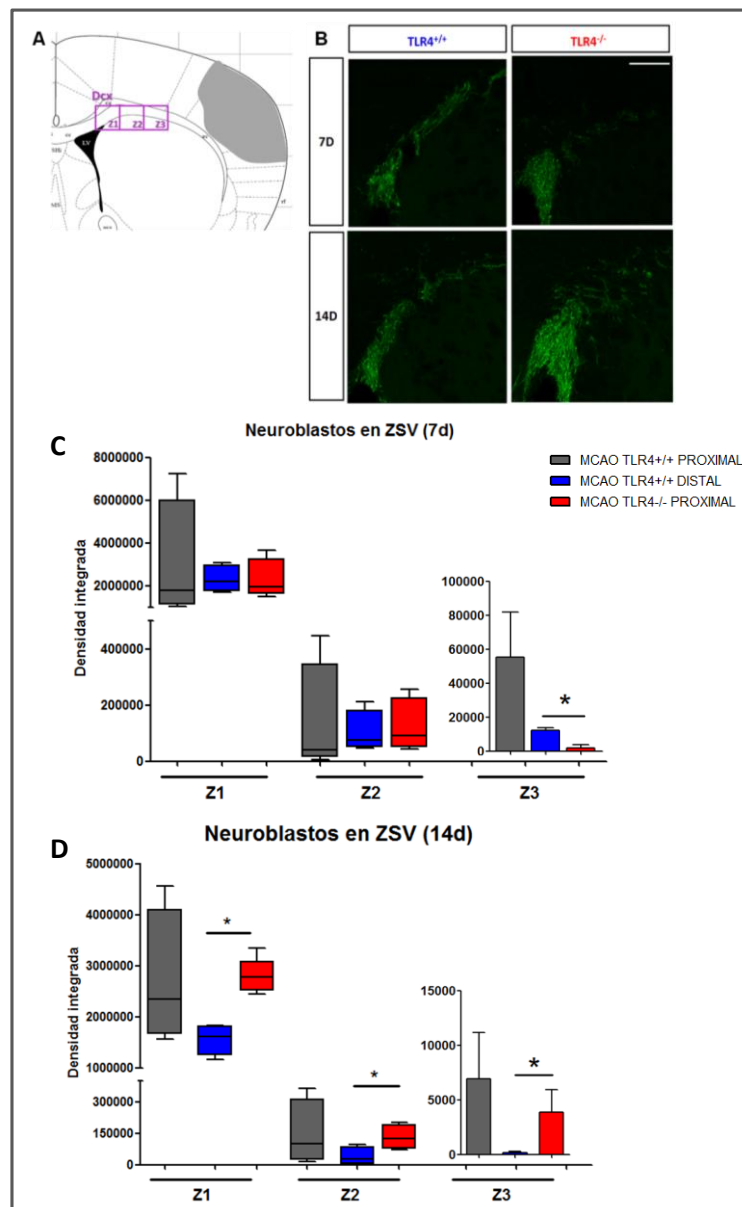
Las autorradiografías muestran cómo los valores estándar de captación del radioligando [ $^{18}\text{F}$ ] FLT aumentan significativamente en el grupo de ratones TLR4 $^{-/-}$  a los 2 y 7 días post-isquemia confirmando los resultados previamente obtenidos. Este efecto se pierde a los 14 días (Figura 4.7B).



**Figura 4.7. Efecto de TLR4 en la proliferación celular en la ZSV tras un ictus. (A).** Representación en secciones coronales de imágenes PET (%ID/cc) a los 2 y 7 días de la isquemia cerebral. Son imágenes acumulativas del radiotrazador [ $^{18}\text{F}$ ] FLT y corregistradas con imágenes de RMN para poder ilustrar las regiones anatómicas. **(B)** Representación gráfica de la captación de radiactividad tras la administración de [ $^{18}\text{F}$ ] FLT en la región de interés (ZSV) a los 2, 7 y 14 días tras la isquemia cerebral. (ID/cc: dosis inyectada por centímetro cúbico; ZSV: zona subventricular; RMN: resonancia magnética nuclear). Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 8-10$  en cada grupo.

#### 4.1.3. Efecto de TLR4 en la migración de neuroblastos hacia la zona isquémica

Para llevar a cabo el estudio de la migración de neuroblastos (células tipo A) analizamos tres zonas migratorias, que van desde la ZSV (Z1) a través del cuerpo calloso (Z2) y hacia la corteza infartada (Z3), a los 7 y 14 días después del inicio del daño isquémico (Figura 4.8).



**Figura 4.8. Efecto de TLR4 en la migración celular tras un ictus experimental.** (A) Diagrama de una sección coronal mostrando las zonas de estudio (Z1, Z2, Z3: recuadros púrpuras). (B) Imágenes representativas de cada grupo. (Barra de escala= 200 µm). (C) Representación gráfica de la migración de neuroblastos desde la ZSV (Z1) hacia la lesión (Z2 y Z3) a los 7 y (D) a los 14 días. Los datos son la media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8 en cada grupo.

Comparando los grupos que no presentaban diferencias en el volumen de infarto (TLR4<sup>+/+</sup> oclusión distal y TLR4<sup>-/-</sup> oclusión proximal), encontramos que no había ningún efecto de la deficiencia de TLR4 sobre el número de neuroblastos (Dcx+) en las Z1 y Z2 a los 7 días. Sin embargo, el número de neuroblastos en Z3 fue mayor en TLR4<sup>+/+</sup> con oclusión distal que en TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal, sugiriendo una migración más rápida en estos animales (Figura 4.8C).

Curiosamente, el número de neuroblastos Dcx+ en todas las zonas migratorias estudiadas a los 14 días aumentó en los TLR4<sup>-/-</sup> cuando se comparó con los TLR4<sup>+/+</sup> (Figure 4.8D; TLR4<sup>+/+</sup> oclusión distal vs. TLR4<sup>-/-</sup> oclusión proximal,  $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que, en el cerebro de los ratones TLR4<sup>+/+</sup>, los neuroblastos migran más rápido hacia el área dañada, lo que puede indicar que la migración está obstaculizada en los animales TLR4<sup>-/-</sup>. En los ratones sham, la densidad de neuroblastos fue menor que en los ratones isquémicos, tanto en el grupo de animales TLR4<sup>+/+</sup> como en TLR4<sup>-/-</sup> (Tabla 8).

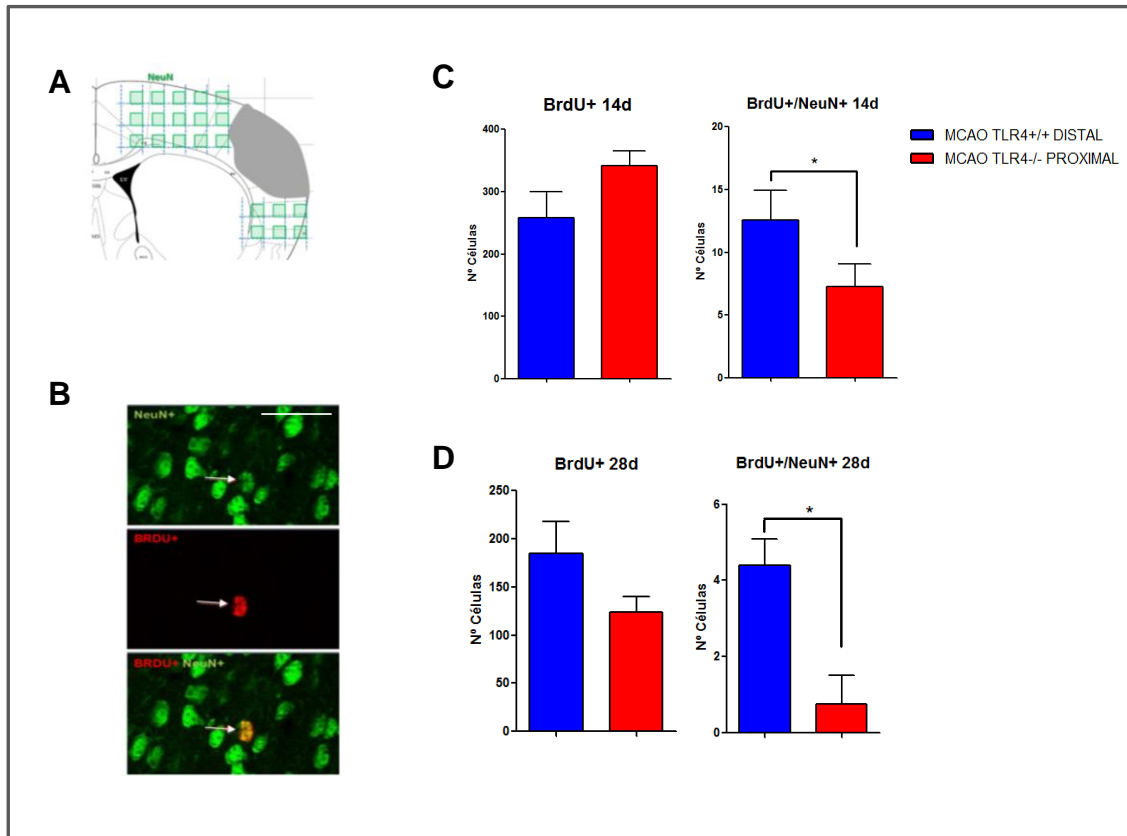
		TLR4 <sup>+/+</sup>		TLR4 <sup>-/-</sup>	
		SHAM	MCAO	SHAM	MCAO
7 días	Z1	1.168.585±273.200	2.511.435±311.601	1.533.636±229.247	2.335.930±486.545
	Z2	9.818±2.098	101.499±37.327	10.277±2.894	121.420±48.250
14 días	Z1	929.564±87.329	1.562.017±151.960	887.412±82.941	2.799.765±163.940*
	Z2	39.811±5.093	38.321±4.040	30.346±4.894	130.044±13.322*

**Tabla 8.** Neuroblastos (células DCX+) cuantificados como densidad integrada, en dos zonas migratorias (Z1, Z2) a los 7 y 14 días en los ratones sham e isquémicos (MCAO), tanto TLR4<sup>+/+</sup> como TLR4<sup>-/-</sup>. \* $p < 0,05$  vs MCAO TLR4<sup>+/+</sup>.

#### 4.1.4. Efecto de TLR4 en la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto

Como último análisis de la neurogénesis, quisimos cuantificar las células que se habían formado tras la isquemia y que, después de alcanzar la corteza, se habían diferenciado a neurona madura. Para ello, estudiamos el número de células BrdU+/NeuN+ que había en la corteza ipsilateral a los 14 y 28 días

después del daño isquémico. Es interesante señalar que encontramos que los ratones  $TLR4^{-/-}$  tenían menos número de células  $BrdU+/NeuN+$  tanto a 14 como a 28 días, que los ratones  $TLR4^{+/+}$  con oclusión distal (Figura 4.9;  $TLR4^{+/+}$  oclusión distal vs.  $TLR4^{-/-}$  oclusión proximal,  $p<0.05$ ). Estos resultados confirman que el número de neuronas que alcanza la corteza peri-infarto es menor en los animales  $TLR4^{-/-}$ . Analizando los animales sham no encontramos células  $BrdU+/NeuN+$ .



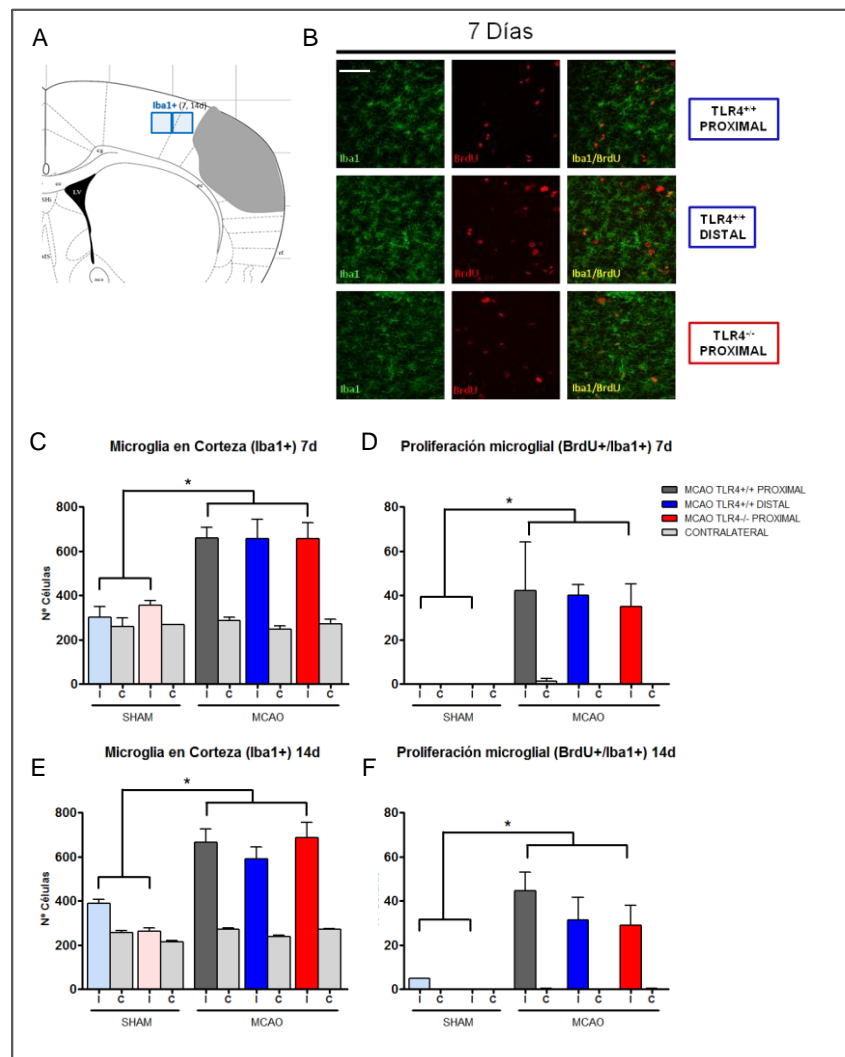
**Figura 4.9. Efecto de TLR4 en la formación de neuronas en la corteza peri-infarto tras ictus experimental.** (A) Diagrama de una sección coronal representativa mostrando la zona cortical de rastreo cuantificadas (recuadros verdes). (B) Imagen representativa de las neuronas (NeuN+) adultas de nueva formación (BrdU+) en la zona de estudio. (C) Número de células BrdU+ totales y BrdU+/NeuN+ cuantificadas a los 14 y 28 días (D) entre los ratones MCAO  $TLR4^{+/+}$  distales y los MCAO  $TLR4^{-/-}$  proximales. (Barra de escala= 25  $\mu$ m) Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p<0,05$ ; n=6-8 en cada grupo.

## 4.2. Estudio del efecto del receptor TLR4 en parámetros inflamatorios tras ictus isquémico experimental

### 4.2.1. Efecto de TLR4 en la proliferación microglial

- En la corteza peri-infarto
- Estudios inmunohistoquímicos

La isquemia focal (MCAO) induce la proliferación microglial como se demuestra al comparar el hemisferio ipsilesional con el contralesional o con los grupos control (Figura 4.10).

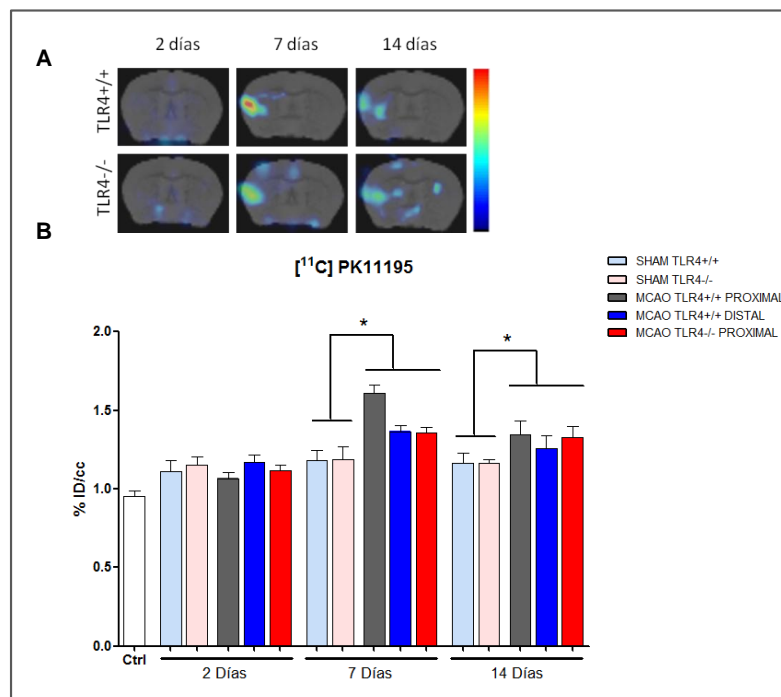


**Figura 4.10. Efecto de TLR4 sobre la proliferación microglial en la corteza peri-infarto.** (A) Diagrama de una sección coronal mostrando la zona de estudio (recuadros azules). (B) Imágenes de microscopía confocal representativas de la zona de corteza parietal donde se ha llevado a cabo la cuantificación de la microglía y la proliferación mediante inmunofluorescencia. (Barra de escala=100µm). (C y E) Representación gráfica del número de células microgliales (Iba1+) cuantificadas en la zona de estudio a los 7 y 14 días tras ictus y (D y F) número de células microgliales que colocalizan con BrdU (BrdU+/Iba1+) a los 7 y 14 días post-isquemia. (I = ipsi; C = contra). Los datos son la media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8.

Observamos un aumento en el número de células tanto Iba1+ como BrdU+/Iba1+ en el área de peri-infarto a los 7 días de producirse la lesión, en todos los grupos isquémicos estudiados (Figura 4.10). Cuando comparamos el número de células microgliales Iba1+ y el número de células microgliales que proliferan en la corteza ipsilateral a los 7 y 14 días tras el daño isquémico, no encontramos ninguna diferencia entre los ratones TLR4<sup>+/+</sup> y los ratones TLR4<sup>-/-</sup>.

### - Estudios por PET

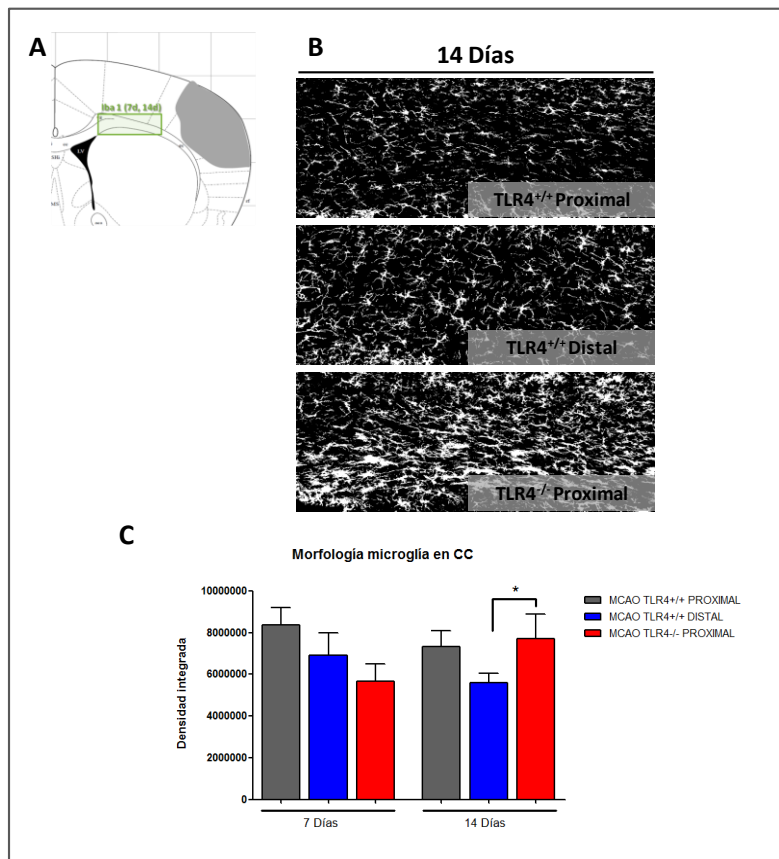
Para comprobar nuestros resultados en la proliferación microglial en la corteza peri-infarto, obtenidos por inmunofluorescencia y citometría de flujo, estudiamos por PET los distintos grupos de animales a los 2, 7 y 14 días tras la isquemia utilizando el marcador microglial [<sup>11</sup>C] PK11195. El marcaje muestra un aumento a los 7 y 14 días tras ictus como habíamos visto en resultados previos, aunque no hay diferencias entre los animales isquémicos TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> (Figura 4.11).



**Figura 4.11. Efecto de TLR4 en la microgliosis después de un ictus experimental. (A)** Representación en secciones coronales de imágenes PET (%ID/cc) a los 2, 7 y 14 días de la isquemia cerebral. Imágenes acumulativas del radiotrazador [<sup>11</sup>C] PK11195, corregistradas con imágenes de RMN para poder ilustrar las regiones anatómicas. **(B)** Representación gráfica de la captación de radiactividad tras la administración de [<sup>11</sup>C] PK11195 en la región de interés (corteza peri-infarto) a los 2, 7 y 14 días tras la isquemia cerebral. (ID/cc: dosis inyectada por centímetro cúbico; ZSV: zona subventricular; RMN: resonancia magnética nuclear). Los datos son la media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8 en cada grupo.

### - En el cuerpo calloso

Posteriormente, analizamos la morfología de la microglía en la corteza y en la zona de migración del cuerpo calloso hacia el infarto para ver si existían diferencias en cuanto a su activación. Para ello, realizamos análisis densitométricos (Zarruk et al., 2012) que nos permitieron ver la densidad celular en la corteza y en el cuerpo calloso. No observamos cambios en la activación microglial en la corteza. Sin embargo, si bien a los 7 días no se observan diferencias, a los 14 se observa una mayor activación microglial, manifestada por una mayor densidad integrada en los animales TLR4<sup>-/-</sup> que en los animales TLR4<sup>+/+</sup> (Figura 4.12). Los animales sham mostraron valores de densidad inferiores.



**Figura 4.12. Efecto de TLR4 en la microgliosis en el cuerpo calloso.** (A) Diagrama de una sección coronal mostrando la zona de estudio (rectángulo verde) (B) Imágenes binarias representativas del análisis densitométrico de la morfología de las células microgliales (Iba1+) en el cuerpo calloso. (C) Representación gráfica de los resultados obtenidos expresados por densidad integrada. Los datos son la media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8 en cada grupo.

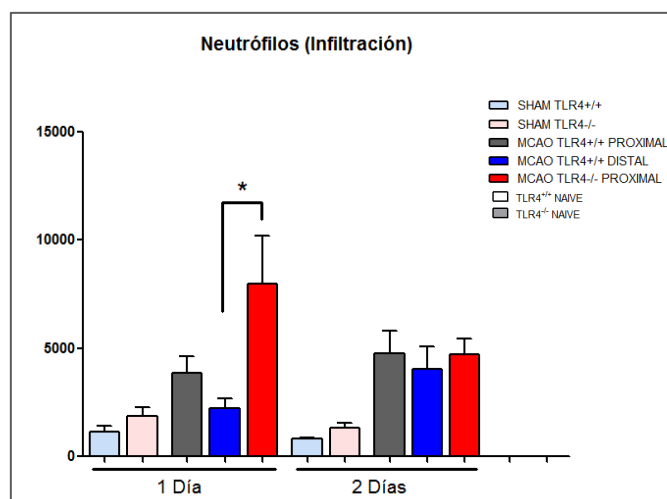


#### 4.2.2. Efecto de TLR4 en la infiltración celular

El estudio de la infiltración leucocitaria en el parénquima cerebral se llevó a cabo por citometría de flujo a partir de la disgregación del tejido cortical peri-infarto (o el tejido equivalente en sham y controles intactos). La primera evidencia es que el número de células infiltradas que se obtiene en los animales isquémicos es muy superior a la de los animales sham. Estas células reclutadas al parénquima isquémico están formadas principalmente por tres poblaciones: neutrófilos, monocitos y linfocitos.

##### - Neutrófilos infiltrados

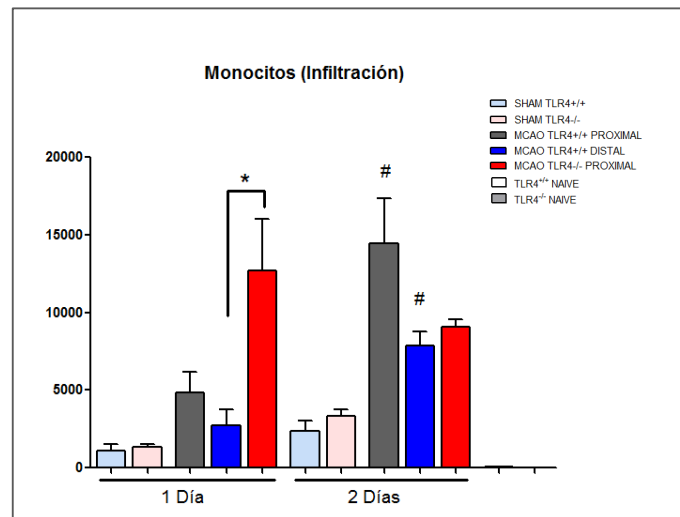
La población de neutrófilos infiltrados resultó ser muy superior en animales TLR4<sup>-/-</sup>, 1 día tras la isquemia, igualándose a los 2 días con los niveles de infiltración de los animales TLR4<sup>+/+</sup> (Figura 4.13).



**Figura 4.13. Efecto de TLR4 en los niveles de neutrófilos infiltrados.** Los niveles de neutrófilos infiltrados fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos vienen expresados como la media  $\pm$  EEM; n=6-8 en cada grupo. \*p<0,05. (Los grupos naive representados al final de la gráfica, no se aprecian porque los valores son muy bajos).

##### - Macrófagos/monocitos infiltrados

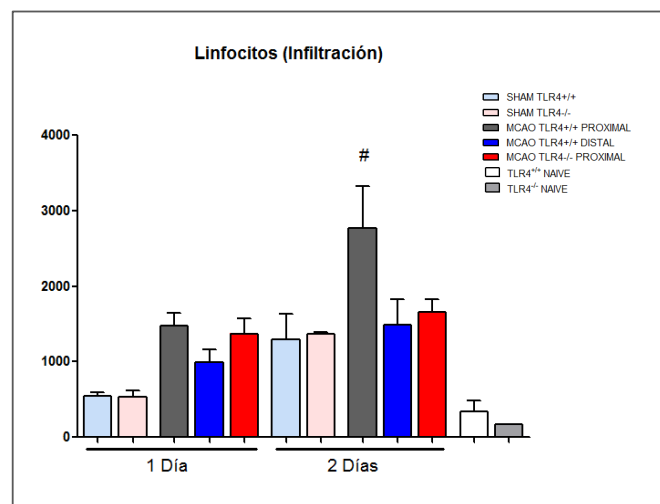
La población de macrófagos/monocitos de los animales TLR4<sup>-/-</sup> se comportan de forma similar al caso anterior, siendo muy superior la proliferación de estas células un día tras la isquemia frente a los animales TLR4<sup>+/+</sup>. Este efecto, nuevamente, se pierde el segundo día. En el caso de los animales TLR4<sup>+/+</sup>, el pico de infiltración se observa a los 2 días (Figura 4.14).



**Figura 4.14. Efecto de TLR4 en la respuesta de los monocitos infiltrados.** Los niveles monocitos infiltrados fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo; # $p < 0,05$  MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 2 días vs MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 1 día. (Los grupos naive, representados al final de la gráfica, no se aprecian porque los valores son muy bajos).

### - Linfocitos infiltrados

Cuando analizamos los niveles de linfocitos infiltrados no observamos ninguna diferencia dependiente de TLR4 a los dos tiempos estudiados (Figura 4.15). En los animales TLR4<sup>+/+</sup> se detectó un pico de infiltración de linfocitos a los 2 días.



**Figura 4.15. Efecto de TLR4 en la respuesta de los linfocitos infiltrados.** Los niveles de linfocitos infiltrados fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $n = 6-8$  en cada grupo. # $p < 0,05$  MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 2 días vs MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 1 día.

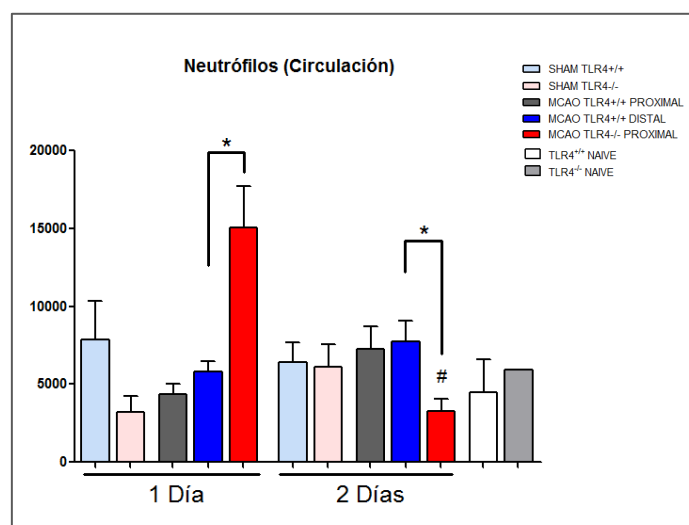
### 4.2.3. Efecto de TLR4 en la respuesta circulante periférica

La inflamación sistémica nos puede dar las claves necesarias para saber en qué medida influyen los leucocitos de la circulación sistémica en aquellos que son reclutados a la zona de daño en la reparación del tejido isquémico.

#### - Neutrófilos circulantes

Mediante citometría de flujo, cuantificamos el número de neutrófilos en la circulación sistémica los días 1 y 2 después de la isquemia.

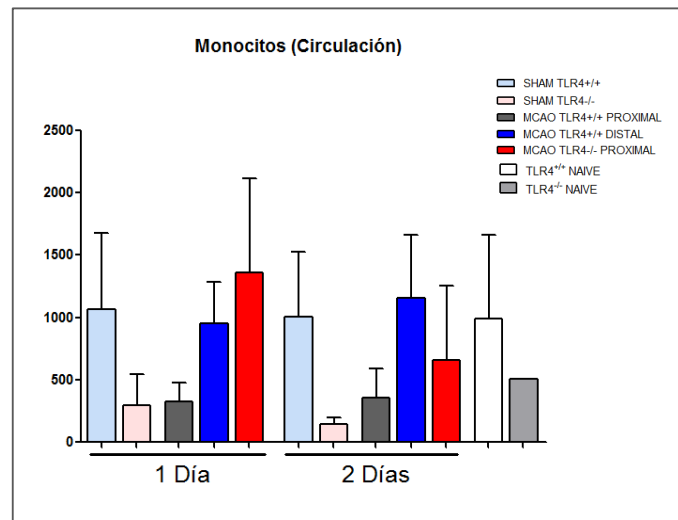
Observamos que los niveles de neutrófilos de los grupos TLR4<sup>+/+</sup> se mantenían estables en los dos tiempos estudiados. Sin embargo, la población de neutrófilos en los animales TLR4<sup>-/-</sup> mostró un pico un día tras la isquemia, cuadruplicando los valores de los animales sham y triplicando a los TLR4<sup>+/+</sup> con igual volumen de infarto. Sin embargo, a los dos días, la tendencia se había invertido y los niveles de neutrófilos caen hasta niveles basales (Figura 4.16).



**Figura 4.16. Efecto de TLR4 en la respuesta de los neutrófilos circulantes.** Los niveles de neutrófilos circulantes fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos son media  $\pm$  EEM;  $n=6-8$  en cada grupo. \* $p<0,05$ ; # $p<0,05$  MCAO TLR4<sup>-/-</sup> 2 días vs MCAO TLR4<sup>-/-</sup> 1 día.

#### - Monocitos circulantes

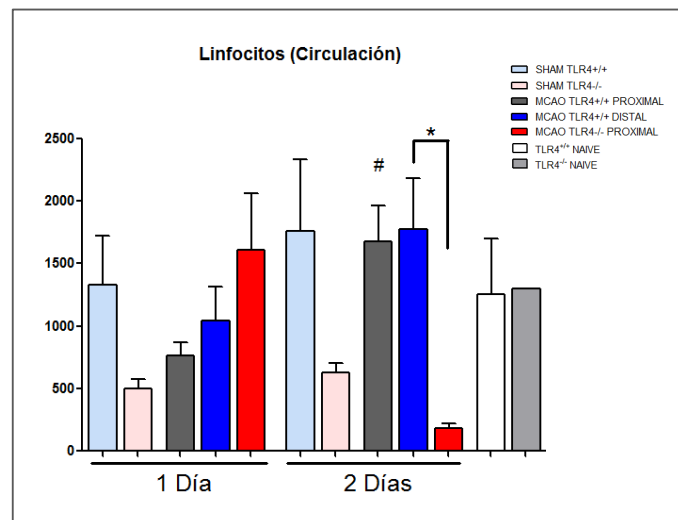
En el caso de los monocitos, la población resultó más heterogénea registrándose valores más variables entre los animales del mismo grupo. No observamos ninguna diferencia dependiente de TLR4 a los dos tiempos estudiados (Figura 4.17).



**Figura 4.17. Efecto de TLR4 en la respuesta de los monocitos circulantes.** Los niveles de monocitos circulantes fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $n=6-8$  en cada grupo.

### - Linfocitos circulantes

El número de linfocitos de los animales TLR4<sup>+/+</sup> mostró un aumento 2 días tras ictus (Figura 4.18), siendo significativamente mayor que el grupo TLR4<sup>-/-</sup>.

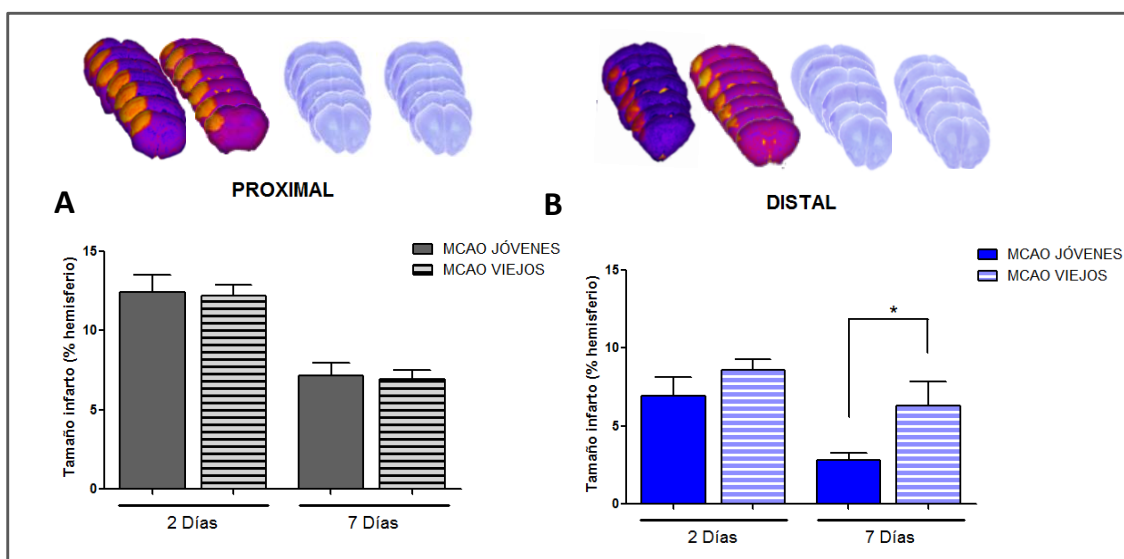


**Figura 4.18. Efecto de TLR4 en la respuesta de los linfocitos circulantes.** Los niveles de linfocitos circulantes fueron determinados por citometría de flujo (ver apartado *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $n=6-8$  en cada grupo; \* $p<0,05$ ; # $p<0,05$  MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 2 días vs MCAO TLR4<sup>+/+</sup> 1 día.

### 4.3. Estudio del efecto de la edad en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental

#### 4.3.1 Efecto de la edad en el tamaño del infarto cerebral

La MCAO se realizó en ratones C57BL/10J jóvenes y viejos, mediante oclusión proximal y distal para obtener tamaños de infarto diferentes. Como cabía esperar, los animales con oclusión proximal tuvieron tamaños de infarto significativamente mayores que los grupos de oclusión distal (Figura 4.19). Tras la oclusión proximal, observamos una regresión de la lesión similar en ambos grupos (jóvenes y viejos) al comparar los volúmenes obtenidos a los 2 y 7 días tras el ictus (Figura 4.19A). Sin embargo, después de la oclusión distal, el área infartada en el grupo de animales viejos no sufrió esta disminución a los 7 días, aunque sí en el grupo de animales jóvenes (Figura 4.19B;  $p < 0,05$ ). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la evolución del infarto depende del tamaño de la lesión inicial.



**Figura 4.19. Efecto de la edad en el desarrollo del infarto.** El tamaño de infarto se determinó por RMN (2 días) y por Nissl (7 días) tras MCAO en ratones jóvenes (2-3 meses; columnas lisas) y en ratones viejos (13-14 meses; columnas rayadas) tras la oclusión proximal (A) y distal (B) de la ACM. Datos: media  $\pm$  EEM:  $n=8$ ;  $*p < 0,05$

#### 4.3.2. Efecto de la edad en la proliferación celular

##### a. Influencia del tamaño del infarto en la proliferación celular en la ZSV

###### - Estudios inmunohistoquímicos

Observamos que el grupo de ratones jóvenes tras la oclusión de la ACM, presenta una correlación positiva entre el tamaño de infarto y la proliferación de células BrdU+ en la ZSV ipsilateral a los 7 días tras la isquemia (Figura 4.20,  $r=0,812$ ,  $n=10$ ,  $p<0,05$ ). Curiosamente, esta correlación se pierde en los grupos de animales viejos (Figura 4.20,  $r=-0,100$ ,  $n=10$ ,  $p>0,05$ ).

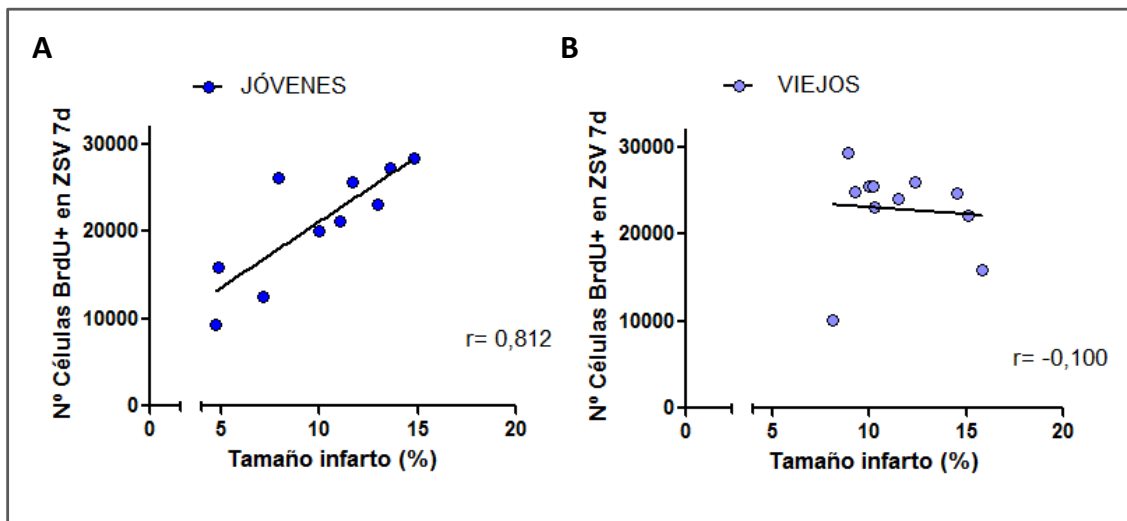
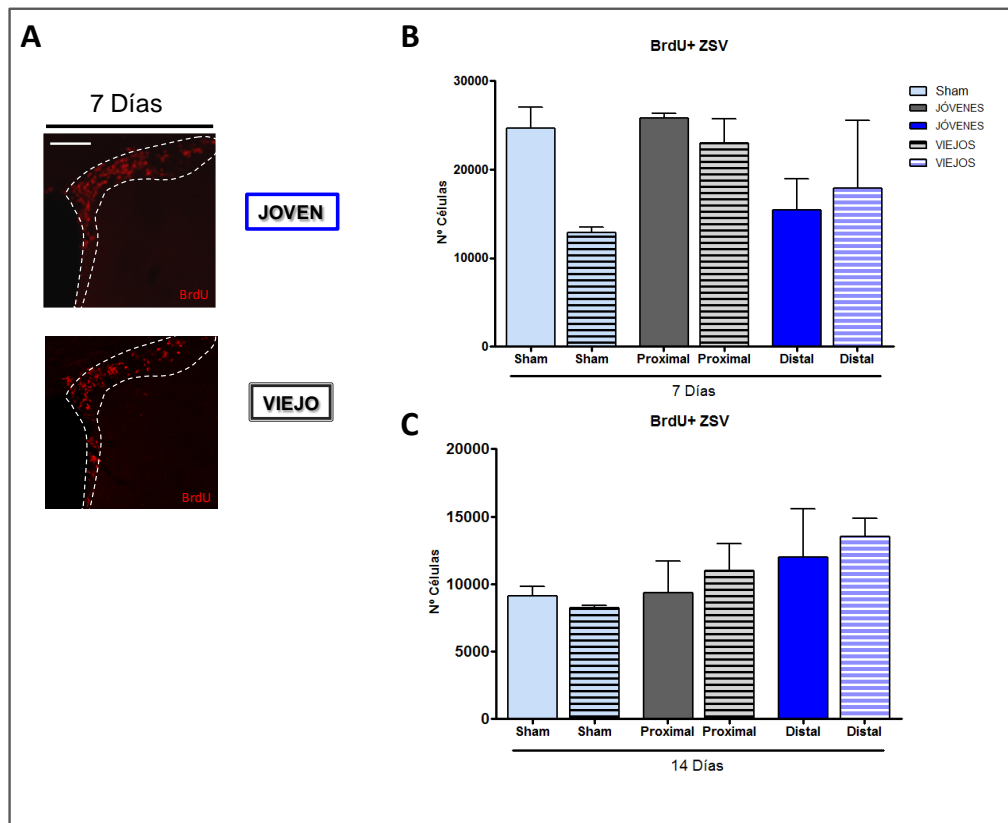


Figura 4.20. Efecto de la edad en la correlación entre la proliferación celular en la zona subventricular y el tamaño de infarto. Correlación entre el número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 días y el tamaño de infarto entre animales jóvenes (A) y viejos (B)  $n=10-11$ .

En este contexto, nuestros datos demuestran que los animales viejos no presentan modificada la proliferación celular en la ZSV después de MCAO distal, como se puede ver por el número similar de células BrdU+ en la ZSV ipsilateral, determinado a los 7 y 14 días tras el daño isquémico, cuando se compara con el grupo de animales jóvenes (Figura 4.21). Sin embargo, en los grupos sham, los animales viejos mostraron menor número de células proliferativas en la ZSV, como previamente se ha descrito para condiciones fisiológicas (Ahlenius et al., 2009).



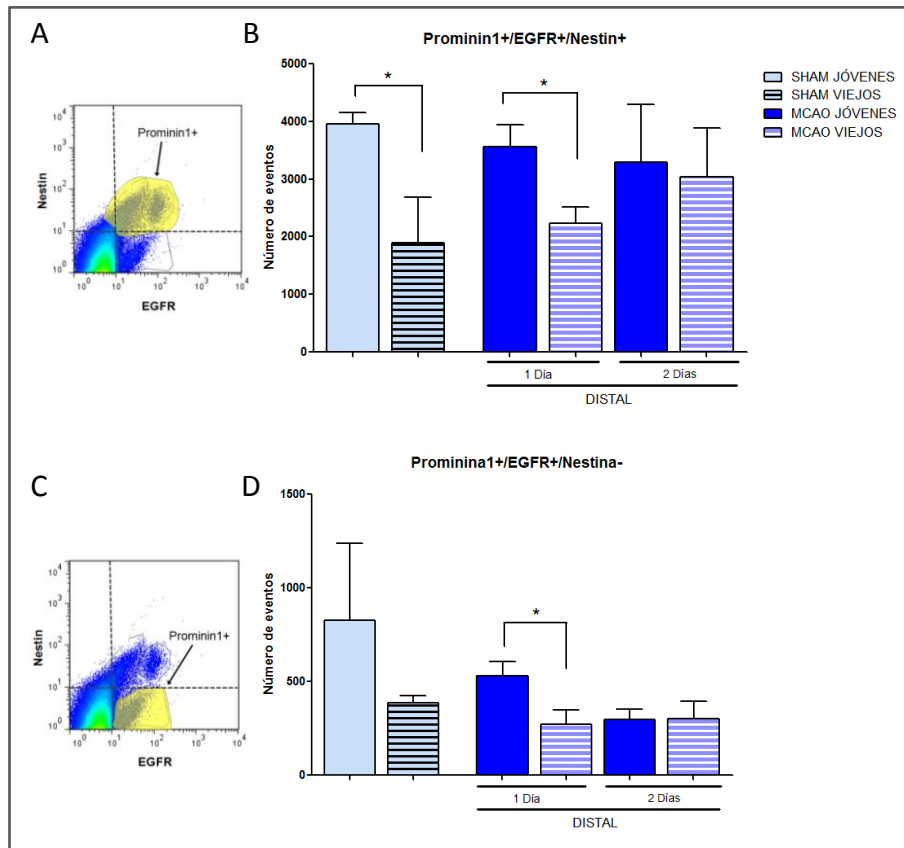
**Figura 4.21. Efecto de la edad en la proliferación celular en la ZSV.** (A) Imágenes representativas de las células BrdU+ en la ZSV (Barra de escala= 200 μm). (B) Número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 y (C) 14 días tras la oclusión de la ACM cuando comparamos ratones jóvenes y viejos. Los datos son la media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8 en cada grupo.

### - Estudios por citometría de flujo

Con el fin de confirmar los resultados anteriormente obtenidos y establecer la naturaleza de las células presentes en la ZSV, también caracterizamos por citometría de flujo los diferentes tipos celulares presentes en la ZSV a tiempos más tempranos (1 y 2 días tras MCAO distal) (Figura 4.22 A y C).

Nuestros resultados muestran que no hay diferencias entre los grupos de animales sham y MCAO. En el caso de la población de células prominina1+/EGFR+/nestina+ observamos diferencias sólo 1 día tras la isquemia, donde los animales jóvenes presentan significativamente más células que los animales viejos (Figura 4.22 B; MCAO joven vs. MCAO viejo; p<0,05). Igualmente vimos que los grupos de ratones jóvenes presentaban mayor número de células prominina1+/EGFR+/nestina- que los ratones viejos 1 día tras la isquemia (Figura 4.22 D MCAO joven vs. MCAO viejo; p<0,05).

Curiosamente a los dos días no se observan diferencias entre jóvenes y viejos en ninguna de las dos poblaciones. También vimos que los grupos de sham viejos presentaban una menor proliferación de las dos poblaciones que los grupos jóvenes (Figura 4.22 B y D).



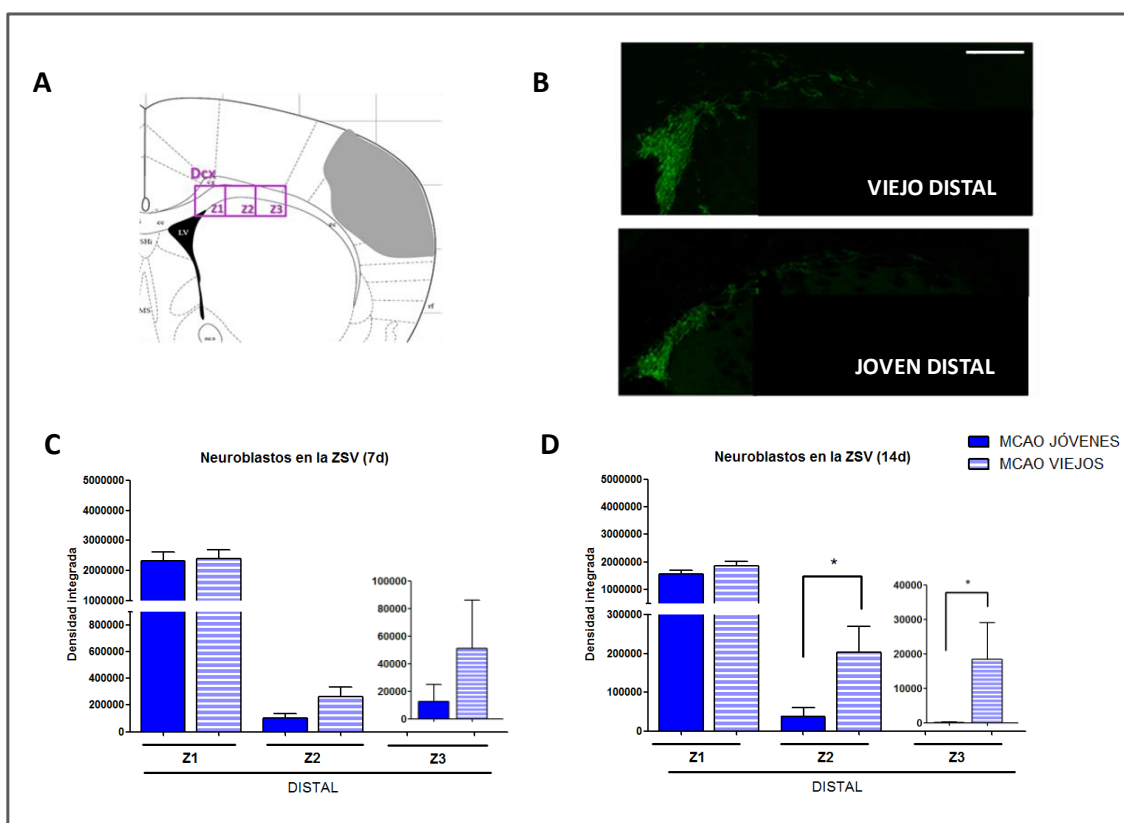
**Figura 4.22. Efecto de la edad en las poblaciones de células madre y progenitores neurales de la ZSV tras ictus experimental.** (A y C) Análisis por citometría de flujo de la ZSV. Dot plots representativos de las poblaciones de interés. (B) Gráficas de los datos obtenidos los días 1 y 2 de las poblaciones Prominin1+/EGFR+/Nestin+ y (D) Prominin1+/EGFR+/Nestin-. Los datos son media ± EEM; \*p<0,05; n=6-8 en cada grupo.

#### 4.3.3. Efecto de la edad en la migración de neuroblastos hacia la zona isquémica

También exploramos el efecto de la edad sobre la población de neuroblastos (células tipo A; Dcx+) en la zona subventricular (Z1 en el esquema A de la Figura 4.23) y en las zonas migratorias contiguas a lo largo del cuerpo calloso (Z2 y Z3) en dirección a la corteza isquémica, a los 7 y 14 días tras el ictus (Figura 4.23).



No encontramos ningún efecto de la edad sobre la densidad de neuroblastos entre ambos grupos y en las 3 zonas a los 7 días de la isquemia. Sin embargo, a los 14 días de la isquemia, la densidad de neuroblastos en las Z2 y Z3 fue mayor en los animales viejos cuando se compara con los jóvenes (Figura 4.23 C y D; MCAO jóvenes vs. MCAO viejos;  $p < 0,05$ ), sugiriendo o una mayor migración o una migración retenida y acumulada en estos animales.

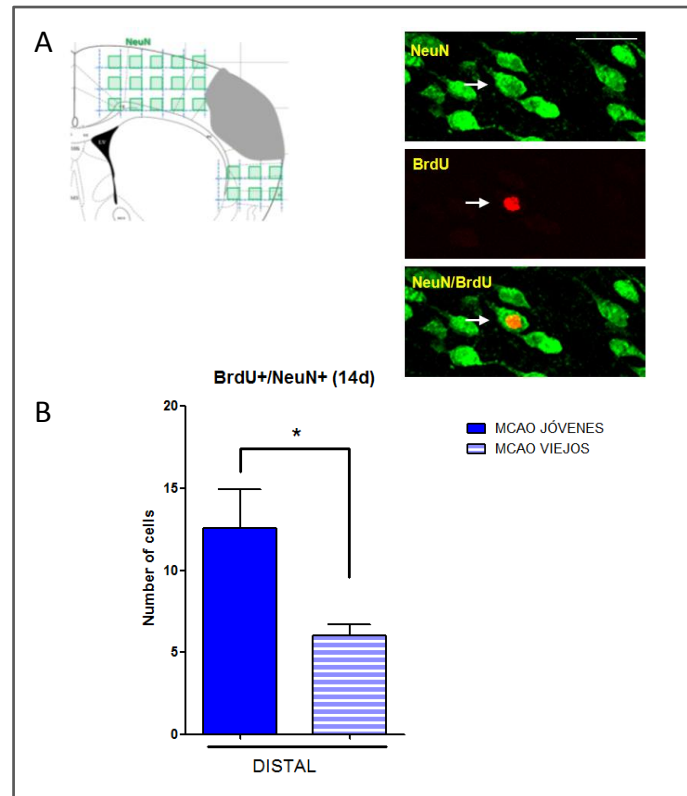


**Figura 4.23. Efecto de la edad en la migración de neuroblastos desde la ZSV hasta la zona infartada.** (A) Diagrama de una sección coronal mostrando la zona de estudio (recuadros púrpuras). (B) Imágenes representativas de los neuroblastos (Dcx+) de las tres zonas de estudio contiguas (Barra de escala= 200µm). (C) Gráficas de la densidad de neuroblastos a los 7 y (D) 14 días de la isquemia. Datos mostrados: media ± EEM, n=6-8; \*p<0,05

#### 4.3.4. Efecto de la edad en la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto

Para finalizar, quisimos saber cuántos de esos neuroblastos llegaban a la corteza y se diferenciaban a neuronas maduras. Para ello, cuantificamos el número de células BrdU+/NeuN+ en la corteza ipsilateral a los 14 días después del daño isquémico. Nuestros datos muestran que los animales viejos, pese a

mostrar mayor número de neuroblastos en las zonas migratorias estudiadas, presentaban menor número de células BrdU+/NeuN+ que los animales jóvenes (Figura 4.24; MCAO jóvenes vs. MCAO viejos,  $p<0,05$ ). No encontramos neuronas nuevas en la corteza de los animales sham.



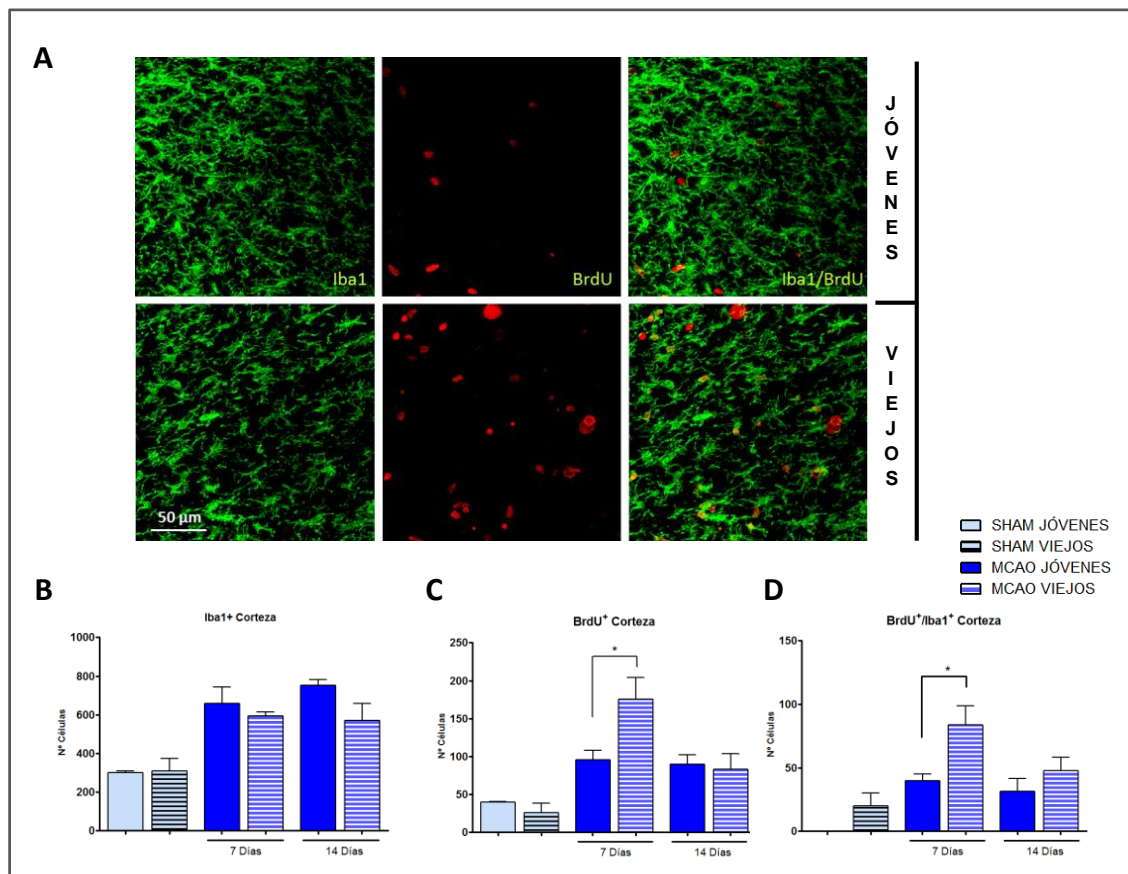
**Figura 4.24. Efecto de la edad en la diferenciación neuronal en la corteza peri-infarto tras MCAO.** (A) Diagrama de una sección coronal representativa mostrando la zona cortical de rastreo cuantificada (recuadros verdes) e imagen representativa de las neuronas (NeuN+) adultas de nueva formación (BrdU+) en la zona de estudio. (B) Representación gráfica de las células BrdU+/NeuN+ cuantificadas a los 14 días. (Barra de escala= 20  $\mu$ m). Los datos son media  $\pm$  EEM; \* $p<0,05$ ; n=6-8 en cada grupo.

#### 4.4. Estudio del efecto de la edad en parámetros inflamatorios tras ictus isquémico experimental

##### 4.4.1. Efecto de la edad en la proliferación microglial

###### - Estudios inmunohistoquímicos

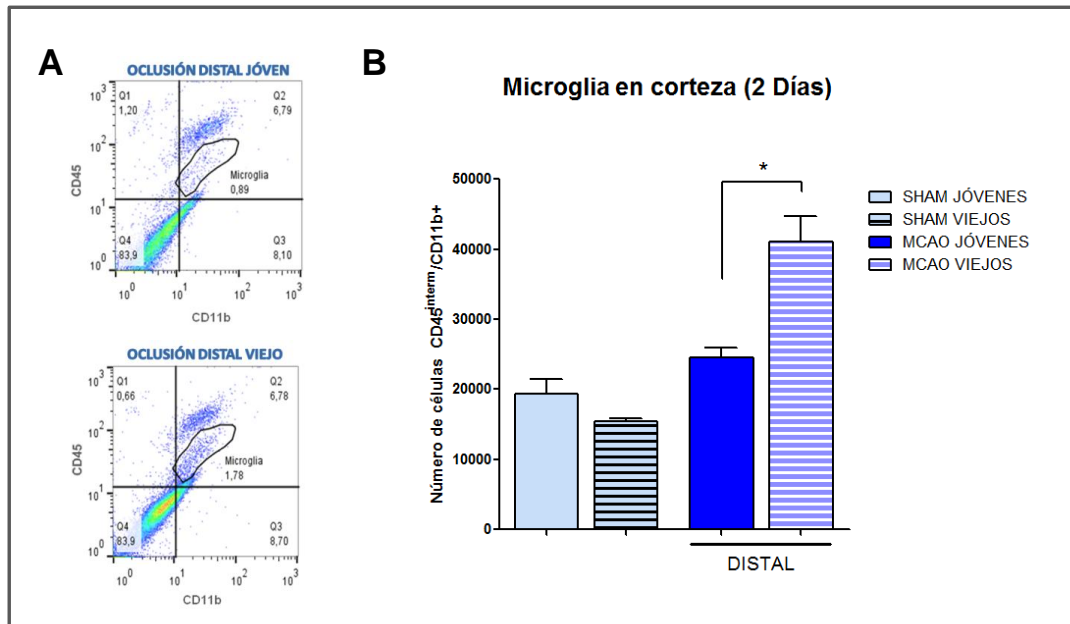
Los grupos de animales viejos mostraron mayor número de células BrdU+ y BrdU+/Iba1+ en el peri-infarto que los animales jóvenes a los 7 días post-isquemia (40% más de células BrdU+ y 60% BrdU+/Iba1+;  $p < 0,05$  viejos vs jóvenes; Figura 4.25 A, C y D). Sin embargo, a los 14 días se perdía ese efecto. La cantidad de células Iba1+ total era similar en animales jóvenes y en viejos a los 7 y 14 días (Figura 4.25 B).



**Figura 4.25. Efecto de la edad en la proliferación microglial de la corteza peri-ictus experimental.** (A) Imágenes representativas de la microglía en la zona de corteza estudiada. Las células (B) Iba1+, (C) BrdU+ y (D) BrdU+/Iba1+ (células microgliales) fueron cuantificadas sobre imágenes confocales digitalizadas. Los datos muestran la media  $\pm$  EEM,  $n=6-8$  en cada grupo. Barra de escala= 50 $\mu$ m. Los datos son media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n=6-8$  en cada grupo.

### - Estudios por citometría de flujo

Apoyando los anteriores resultados, los estudios realizados por citometría de flujo revelaron un comportamiento similar de la microglía ( $CD45^{interm}/CD11b+$ ) en el área del peri-infarto dos días después de la isquemia (Figura 4.26;  $p<0,05$ ).

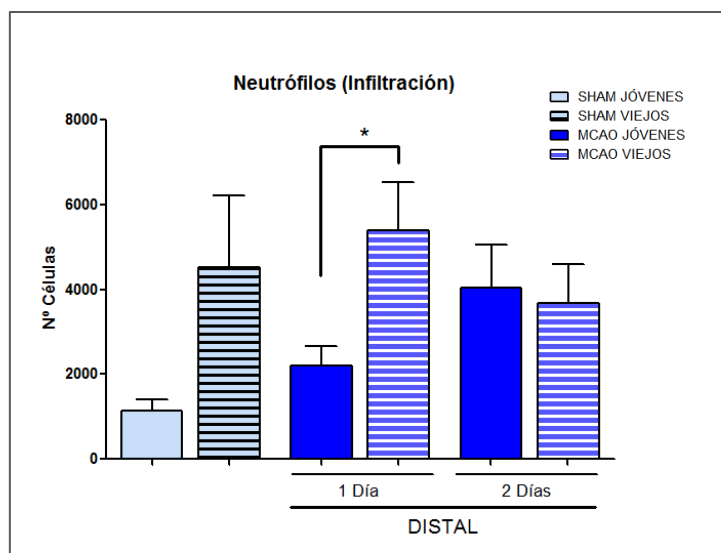


**Figura 4.26. Efecto de la edad en la proliferación microglial de la corteza peri-infarto tras ictus experimental.** (A) Dot plots representativos de la subpoblación  $CD45^{interm}$  y  $CD11b+$  en la suspensión celular de la corteza del peri-infarto dos días tras el ictus. (B) Análisis por citometría de flujo de la microglía en el área peri-infarto dos días tras ictus. Los datos son media  $\pm$  EEM; \* $p<0,05$ ;  $n=6-8$  en cada grupo.

### 4.4.2. Efecto de la edad en la infiltración celular

#### - Neutrófilos infiltrados

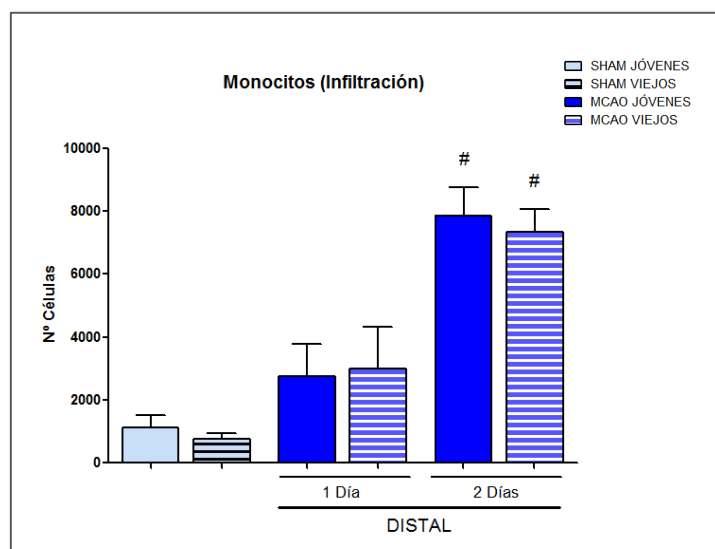
La población de neutrófilos reclutada en la corteza isquémica cerebral se estudió por citometría de flujo los días 1 y 2 tras la isquemia. El análisis mostró un aumento significativo en el grupo de los animales viejos frente a los jóvenes 1 día tras la isquemia (Figura 4.27;  $p<0,05$ ).



**Figura 4.27. Efecto de la edad en la respuesta de los neutrófilos infiltrados en la corteza isquémica.** Los niveles de neutrófilos fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.

#### - Macrófagos infiltrados

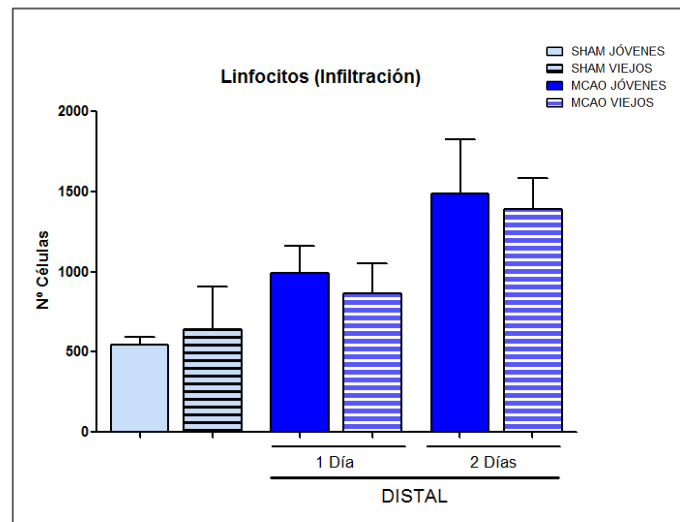
Los niveles de macrófagos/monocitos infiltrados en el tejido no mostraron diferencias con respecto a la edad y a los tiempos estudiados. Observamos un aumento significativo dos días tras la isquemia tanto en el grupo de los animales jóvenes como viejos (Figura 4.28).



**Figura 4.28. Efecto de la edad en la respuesta de los monocitos infiltrados en la corteza isquémica.** Los niveles de monocitos infiltrados fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $n = 6-8$  en cada grupo # $p < 0,05$  MCAO 2 días vs MCAO 1 día.

### - Linfocitos infiltrados

Al estudiar la extravasación de linfocitos no observamos ninguna diferencia ni con respecto a la edad de los animales, ni a los tiempos estudiados (Figura 4.29).



**Figuras 4.29. Efecto de la edad en la respuesta de los linfocitos infiltrados en la corteza isquémica.** Los niveles de linfocitos infiltrados fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM;  $n=6-8$  en cada grupo.

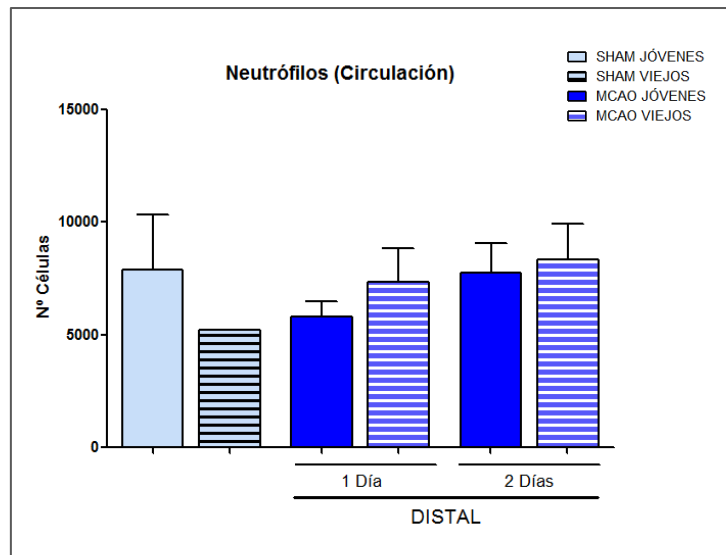
#### 4.4.3. Efecto de la edad en la respuesta circulante periférica

Al igual que en el bloque anterior, decidimos estudiar la inflamación sistémica pero, en este caso, para saber cómo influye la edad en la respuesta de los leucocitos de la circulación sistémica y su reclutamiento en la zona de daño.

El primer aspecto que nos interesaba saber era si la edad y la isquemia estaban alterando la cantidad total de células inmunes del torrente sanguíneo, es decir, la reacción inflamatoria en la circulación sistémica. Para ello, estudiamos de nuevo las poblaciones de neutrófilos, monocitos y leucocitos.

### - Neutrófilos circulantes

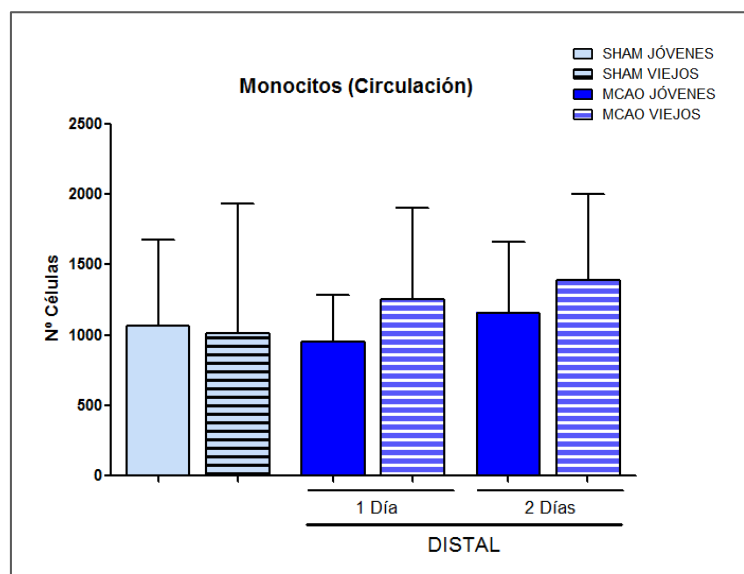
La población de neutrófilos a nivel sistémico mostró niveles muy similares entre los distintos grupos y a los tiempos estudiados. Por tanto, la edad no parece estar alterando la cantidad de neutrófilos sanguíneos tras el ictus experimental (Figura 4.30).



**Figura 4.30. Efecto de la edad en la respuesta de los neutrófilos circulantes.** Los niveles de neutrófilos fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM; n=6-8 en cada grupo.

### - Monocitos circulantes

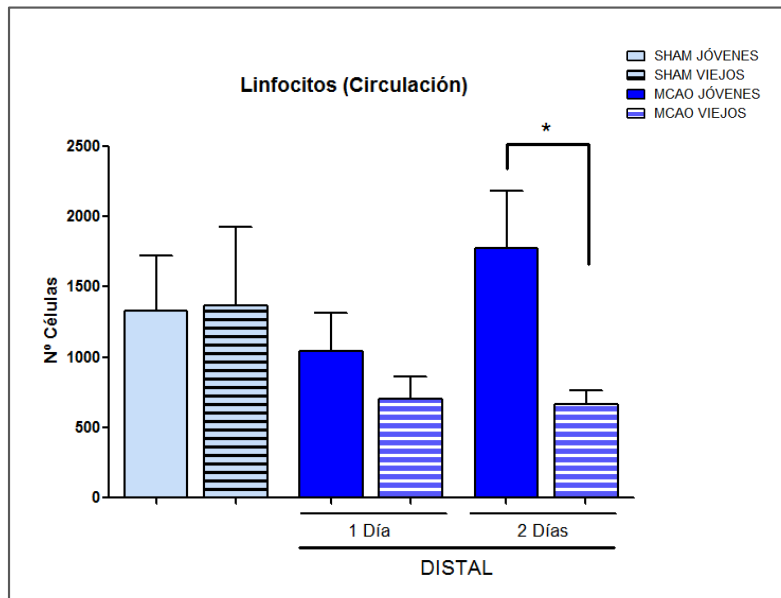
Cuando analizamos los monocitos en el torrente sanguíneo, tampoco vimos diferencias entre los animales jóvenes y viejos y a los tiempos estudiados (Figura 4.31).



**Figura 4.31. Efecto de la edad en la respuesta de los monocitos circulantes.** Los niveles de monocitos circulantes fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM; n=6-8 en cada grupo.

### - Linfocitos circulantes

En los niveles de linfocitos, se observa un pico el día 2 en los animales jóvenes que no se observa en los animales viejos (Figura 4.32).



**Figura 4.32. Efecto de la edad en la respuesta de los linfocitos circulantes.** Los niveles de linfocitos circulantes fueron determinados por citometría de flujo (ver *Materiales y Métodos*), 1 y 2 días tras la isquemia en los grupos representados. Los datos son la media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ ;  $n = 6-8$  en cada grupo.





# DISCUSIÓN





## 5. DISCUSIÓN

A lo largo de esta tesis doctoral, hemos explorado el papel de TLR4 en la proliferación de distintos tipos celulares, así como en la migración de neuroblastos y en la diferenciación neuronal después de un ictus isquémico experimental, utilizando un modelo de isquemia focal permanente en ratones, normales o con delección génica del receptor TLR4. También, hemos estudiado en estas condiciones el proceso inflamatorio tanto a nivel central como periférico. Por último, hemos explorado la influencia de la edad en estos mismos procesos. Para ello, hemos reproducido en ratones viejos, muchos de los experimentos llevados a cabo en ratones jóvenes.

Nuestros datos muestran una serie de evidencias que hemos dividido en dos bloques que iremos discutiendo a continuación.

### A. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR TLR4 EN LA NEUROGÉNESIS TRAS ICTUS ISQUÉMICO EXPERIMENTAL

#### Infarto y TLR4

En el presente estudio hemos descrito que el receptor TLR4 está implicado en el daño cerebral que se produce después de un ictus experimental, resultados que están de acuerdo con los previos publicados por nuestro grupo (Caso et al., 2007). Así, hemos observado que los ratones que expresan de forma normal el receptor TLR4 (TLR4<sup>+/+</sup>) presentan volúmenes de infarto significativamente mayores que los ratones deficientes para TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>).

En nuestro grupo de investigación describimos que los ratones deficientes para TLR4 presentaban, tras el ictus, menores niveles de expresión de IRF-1, iNOS, COX-2 y MMP9, todos ellos mediadores pro-inflamatorios que han sido implicados en el daño isquémico. Además, también presentaban niveles reducidos de interferon- $\beta$  y de malondialdehído (un marcador de peroxidación lipídica) (Caso et al., 2007). En definitiva, demostramos que la señalización TLR4 induce una potente respuesta inflamatoria que estaba mediando el daño cerebral tras un ictus (Caso et al., 2007).

Varios trabajos, simultáneos o posteriores, han venido a confirmar la participación de distintos TLRs en el daño isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007; Tang et al., 2013), poniendo de manifiesto el hecho de que esta patología siempre va acompañada de una fuerte respuesta inflamatoria, mediada en gran medida por la activación de estos receptores (Aderem and Ulevitch, 2000).

### **Proliferación en la ZSV y TLR4**

Se ha descrito que, bajo condiciones fisiológicas, la ZSV es un área activa donde persiste la neurogénesis en el cerebro adulto, y que contiene células precursoras neurales proliferativas que se diferencian a neuroblastos y que migran a lo largo de la ruta migratoria rostral hasta el bulbo olfatorio (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). También se ha descrito que, después de un ictus, existe un aumento de la proliferación en la ZSV (Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002).

En este contexto, nuestros resultados muestran por primera vez que, en condiciones isquémicas, la proliferación celular de la ZSV (de células marcadas 5-6 días tras la oclusión y medida al día 7º) depende del tamaño del infarto. De hecho, hemos visto que existe una fuerte correlación positiva entre el tamaño de infarto y la proliferación celular determinadas en la ZSV ipsilateral a los 7 días del infarto. Se sabía, como hemos dicho antes, que grandes infartos estriatales producía un aumento de la proliferación en la ZSV (Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002), sin embargo, la relación directa entre infartos corticales y el tamaño de la lesión no había sido descrita hasta ahora. Es importante destacar que cuando determinamos la correlación a los 14 días de producirse la lesión, ésta deja de ser positiva y se hace negativa. Estos hallazgos podrían explicarse por el protocolo de inyecciones de BrdU que hemos utilizado, ya que podríamos estar sobreestimando la población que prolifera en la ZSV por diferentes causas. Primero, las células marcadas que estamos midiendo son sólo aquellas que están proliferando cuando se aplica el pulso de BrdU, es decir los días 5 y 6 después de la isquemia. Segundo y más importante, el ictus no sólo aumenta la proliferación celular en la ZSV sino que también aumenta los procesos migratorios de las nuevas células hacia el sitio

del daño (Luskin, 1993; Arvidsson et al., 2002; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007), disminuyendo así el número de células proliferativas en la ZSV. Este fenómeno puede hacer que no se aprecie un cambio aparente en el número total, cuando se comparan entre sí distintos grupos (MCAO y sham) y en un momento determinado. Así, el número de células que proliferan en un momento concreto en la ZSV resulta del balance entre la proliferación y la migración. En este contexto, nuestros datos obtenidos en animales sham, mostrando niveles más elevados que en los grupos de animales isquémicos (a pesar de la correlación positiva con el tamaño de la lesión a los 7 días), apoyan esta afirmación y están de acuerdo con los datos de proliferación -15-21%- descrito en animales postnatales (Schultze and Korr, 1981; Smith and Luskin, 1998).

Segundo, nuestros resultados muestran que, en condiciones fisiológicas, los ratones TLR4<sup>+/+</sup> tienen un menor número de células BrdU+ en la ZSV cuando se compara con los animales TLR4<sup>-/-</sup>. Estos datos indican que TLR4 inhibe de forma fisiológica la proliferación en la ZSV, corroborando resultados previamente publicados por otros autores (Rolls et al., 2007).

Tercero, nuestros datos demuestran por primera vez que la presencia de TLR4 inhibe la proliferación celular de la ZSV tras procesos de ictus. Estos resultados son de gran importancia ya que no se habían descrito previamente. Concretamente, hemos visto que se reduce la población de células Prominina1+/EGFR+/Nestina- al 1º y 2º día post-ictus (estudios citométricos) y de células BrdU+ a los 7 días después del daño isquémico en la ZSV ipsilesional de ratones que expresan normalmente TLR4 comparados con el grupo de ratones TLR4<sup>-/-</sup> con tamaños de infarto similares. Estas células corresponden a la población de progenitores de amplificación transitoria (células tipo C), en un estadio (tipo 3) justo anterior al de convertirse en neuroblastos pero que aún mantienen su potencial proliferativo (EGFR+). Este mismo tipo de célula fue descrito por Kempermann en la zona subgranular del giro dentado, que es la zona neurogénica del hipocampo (Kempermann et al., 2004; Ming and Song, 2011). Por el contrario, el otro tipo celular que hemos estudiado que corresponden con células madre tipo B (células tipo B: prominina1+/EGFR+/nestina+) no parecen estar afectadas por la presencia o ausencia de TLR4.

Los estudios realizados con tomografías por emisión de positrones (técnicas no invasivas y de gran resolución), también apoyan nuestras conclusiones sobre el efecto inhibitorio de TLR4 en la proliferación de la ZSV tras ictus. Estas técnicas (PET) y usando el mismo radiotrazador [ $^{18}\text{F}$ ] FLT ya habían sido utilizados para el estudio de la proliferación y neurogénesis adulta (Rueger et al., 2012), pero nunca se habían usado para estudiar la participación de TLR4.

Por tanto, nuestros datos indican que el ictus, en la ZSV, induce una compleja respuesta proliferativa, con la participación simultánea de factores estimuladores e inhibidores: mientras el receptor TLR4 juega un papel inhibidor, la presencia de un mayor nº de células proliferativas tras lesiones mayores indica que otro/s factor/es la incrementan, aunque su estudio no se aborda en la presente Tesis Doctoral.

### **Migración de neuroblastos y TLR4**

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la deficiencia de TLR4 retrasa el proceso de migración de neuroblastos desde la ZSV hacia el área dañada. En nuestro estudio, examinamos la población de neuroblastos (células tipo A) en tres zonas migratorias que se extienden desde la ZSV (Z1), a través del cuerpo calloso (Z2) y hacia la lesión isquémica (Z3), en dos tiempos diferentes, 7 y 14 días tras el daño isquémico. Una semana después de producirse el infarto, observamos que los neuroblastos de los ratones TLR4<sup>+/+</sup> son capaces de migrar a mayor distancia y alcanzar áreas más cercanas a la región dañada (Z3) que los neuroblastos presentes en los animales TLR4<sup>-/-</sup>.

Por el contrario, a los 14 días, observamos que la densidad de neuroblastos -en las 3 áreas estudiadas- disminuía en los ratones TLR4<sup>+/+</sup> cuando se comparaban con los datos de 7 días, lo que estaba de acuerdo con el proceso de migración hacia el área dañada descrito. Sin embargo, los valores de las densidades de neuroblastos en Z1-Z3 de los ratones TLR4<sup>-/-</sup> a los 14 días eran similares a los valores obtenidos en 7 días y superiores a aquellos vistos en los ratones TLR4<sup>+/+</sup>, indicando que la migración en los animales TLR4<sup>-/-</sup> está enlentecida o incluso retenida, y sugiriendo así que TLR4 es crucial para la migración de neuroblastos hacia la zona dañada.



Además, se observa a los 14 días que la microglía de la zona del cuerpo calloso (Z2 y Z3) aparece más activada en los animales TLR4<sup>-/-</sup>, lo que podría sugerir que está participando en procesos de fagocitosis de los neuroblastos que han quedado irremediablemente retenidos en esa zona donde no son viables. Futuros ensayos de fagocitosis *in vivo* podrían esclarecer esta hipótesis. Teniendo en cuenta los efectos duales de un daño isquémico sobre la proliferación en el nicho neurogénico subventricular, nuestros hallazgos sugieren que el principal efecto del ictus sobre el proceso de neurogénesis se ejerce a nivel de la migración, probablemente conducido por “factores intrínsecos” inducidos por el daño isquémico.

En relación con este punto, ya hemos comentado que el ictus es capaz de promover la migración de neuroblastos hacia el sitio del daño (Arvidsson et al., 2002; Zhang et al., 2006; Saha et al., 2012), aunque todavía no se conocen bien los mecanismos implicados. Nuestros estudios son los primeros en indicar la implicación de TLR4 en este proceso. Otros estudios han demostrado que la sobre-expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y del factor derivado de células estromales 1 $\alpha$  (SDF1 $\alpha$ ) en cerebros dañados proporciona las señales quimiotácticas que atraen a los neuroblastos (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Yan et al., 2007). En este contexto, estudios previos que demuestran que la expresión de MCP-1 es menor en ratones TLR4<sup>-/-</sup>, podrían explicar, al menos en parte, la migración defectuosa observada en los ratones deficientes para TLR4 (Chong et al., 2004; Ao et al., 2009). Además, también se ha relacionado a la MMP9 como factor esencial para la migración de neuroblastos ya que se ha demostrado que la inhibición de MMPs suprime significativamente el movimiento de los neuroblastos desde la ZSV al tejido dañado (Lee et al., 2006). Nuestros resultados previos, mostrando una menor expresión de MMP9 en ratones TLR4<sup>-/-</sup> tras ictus (Caso et al., 2007), podrían apoyar la peor migración, como ahora hemos descrito.

Estas evidencias sugieren el interés que podría tener describir los mecanismos a través de los que TLR4 está participando en el proceso. Para ello, serían necesarios ensayos de migración *in vitro* con neurosféricas, en presencia y ausencia de TLR4, que podríamos estimular con los factores quimiotácticos que operan *in vivo*, como son MCP-1, y SDF1 $\alpha$ , y el factor MMP9, para ver si el efecto sobre la migración es directo.



Sin embargo, no podemos descartar que TLR4 pudiera estar participando en el proceso de migración de neuroblastos a través de un mecanismo indirecto aumentando su expresión en los astrocitos del cuerpo calloso (ya que TLR4 no se expresa en neuroblastos), los cuales se encargan de formar el tubo glial que guía la migración de los neuroblastos.

### **Diferenciación celular y TLR4**

Finalmente, hemos descrito que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> tienen un menor número de nuevas neuronas (BrdU+/NeuN+) en la zona cortical peri-infarto a los 14 y 28 días tras el ictus, lo cual concuerda con la supresión del proceso de migración visto anteriormente. Aunque el número encontrado parece relativamente bajo, ello se debe a que lo que se muestra en las figuras sólo representa la fracción de células que alcanza el infarto y se diferencian a neuronas entre las que habían proliferado en los días 5 y 6 tras la isquemia, que fue el momento en el que se administró el pulso de BrdU. Estos resultados apoyan un papel para TLR4 como mediador en el proceso de neurogénesis inducido por la isquemia a través de un aumento en la migración a pesar de una proliferación reducida. No podemos descartar que TLR4 pudiera también afectar a otros mecanismos como son la diferenciación y la supervivencia neuronal. Serían necesarios más estudios y examinar con más detenimiento los resultados comportamentales a largo plazo y estudiar la implicación de TLR4 sobre los procesos de neurorreparación a tiempos más tardíos.

### **Parámetros inflamatorios y TLR4**

En la presente Tesis Doctoral hemos llevado a cabo distintas aproximaciones para estudiar el efecto de TLR4 sobre la proliferación en el proceso inflamatorio.

Por un lado, hemos estudiado la proliferación microglial (BrdU+/Iba1+) y la proliferación general (BrdU+ total) en la corteza peri-infarto, y hemos visto que ambas son independientes de TLR4 a los tiempos estudiados (7 y 14 días). Existen diferentes razones que podrían justificar los resultados encontrados. En primer lugar, hay grupos que señalan que la activación microglial es TLR4-independiente (Chen et al., 2012b; Fukagawa et al., 2013), de acuerdo con nuestros datos. Pero además, no podemos descartar que existan cambios que

no hemos podido detectar, como son: i) que no diferenciamos el tipo de microglía y/o macrófago estudiada (con fenotipo pro-inflamatorio M1 o alternativo anti-inflamatorio M2), ii) que el tipo de células que estemos determinando sean microglía residente o macrófagos infiltrados, y iii) que la microglía detectada esté activada o en reposo (Ito et al., 2001; Badan et al., 2003a; Hu et al., 2012b; Scheffel et al., 2012).

De forma general está aceptado que la señalización por TLR4 está implicada en la activación clásica de la microglía, que reduce la fagocitosis, aumenta la secreción de mediadores pro-inflamatorios y produce daño neuronal, que corresponden a un tipo de microglía/macrófago al que se denomina fenotipo clásico o M1. Sin embargo, también se ha descrito otro fenotipo llamado alternativo o M2 con células cuya actividad fagocítica es más intensa y la producción de mediadores pro-inflamatorios más reducida (Hu et al., 2012a). Ambos fenotipos se han descrito después del ictus pero con distintos perfiles temporales (Hu et al., 2012a). TLR4 es un receptor clave en estos procesos: por un lado, inicia la activación clásica (Mosser and Edwards, 2008) por LPS y otros DAMPs, además, el propio receptor TLR4, en presencia de complejos inmunes, induce un fenotipo alternativo M2b (Mantovani et al., 2004). En este sentido, se ha demostrado que TLR4, a través de la vía dependiente de TRIF y activando IRF3, promovería la conversión del fenotipo microglial M1 al anti-inflamatorio M2 (Tarassishin et al., 2011). De cualquier forma, deben realizarse estudios más amplios y bajo condiciones isquémicas para establecer cuáles de estas vías se activan por TLR4, y cómo se modulan, ya que los efectos son diferentes.

Por otro lado, también hemos descrito cómo se comportan otras células inmunes tras el estímulo isquémico, tanto en la circulación periférica como aquellas que se infiltran al tejido dañado. Sorprendentemente, hemos observado que hay un número mayor de células infiltradas (neutrófilos y monocitos) en los animales TLR4<sup>-/-</sup> que en los animales TLR4<sup>+/+</sup>. Ya hemos comentado que el ictus desencadena una fuerte respuesta inflamatoria caracterizada no sólo por la rápida activación de células residentes (principalmente microglía) sino también por una mayor infiltración de células inflamatorias circulantes (neutrófilos, monocitos y/o macrófagos, linfocitos)(para

revisión ver (Gelderblom et al., 2009; Jin et al., 2010). De hecho, se tiende a pensar que a mayor lesión isquémica, mayor activación microglial y mayor reclutamiento de células, sin embargo trabajos recientes ponen en duda estas afirmaciones.

En este sentido, existen evidencias que señalan al receptor TLR4 como iniciador del reclutamiento de leucocitos (Zhou et al., 2006; Zhou et al., 2009) y de hecho el efecto neuroprotector del antagonista de TLR4 (TAK 242), se debería, al menos en parte, a una menor infiltración de células inflamatorias periféricas (Wang et al., 2013). Sin embargo, como comentábamos previamente, TLR4 es un actor clave en la polarización de células mieloides. En este sentido, está cada vez más claro que, además de macrófagos, los neutrófilos son susceptibles de sufrir esta polarización, de tal manera que su ausencia podría desencadenar una activación “alternativa” de los neutrófilos, y con mayor velocidad y/o capacidad de infiltración. En efecto, recientemente nuestro grupo ha publicado que, tras ictus, la población de neutrófilos que infiltra el cerebro es heterogénea, lo que se manifiesta existiendo una población de neutrófilos que expresan marcadores asociados al fenotipo alternativo de macrófagos, y a los que hemos denominado neutrófilos alternativos N2. Además, hemos encontrado que el efecto neuroprotector de agonistas PPAR-gamma como la rosiglitazona, es concomitante con un aumento en la población de neutrófilos infiltrantes N2, que infiltran mucho más rápido y que facilitarían la reparación del tejido a través de mecanismos de fagocitosis (Cuartero et al., 2013; Ballesteros et al., 2014). De nuevo, y para intentar esclarecer este aspecto, serían necesarios más estudios determinando el fenotipo de las poblaciones de macrófagos (M1 y M2) y de neutrófilos (N1 y N2) mediante el uso de marcadores propios de fenotipo alternativo como son Ym1, CD36, etc.

## **CONCLUSIÓN**

Nuestros datos indican que el receptor TLR4, a pesar del efecto inhibitorio que tiene en la proliferación celular de la ZSV, desempeña un importante papel en la neurogénesis inducida por ictus, promoviendo la migración de neuroblastos y aumentando el número de nuevas neuronas corticales durante la fase crónica del ictus. Una posibilidad interesante es que, en una acción conjunta, TLR4 frene un posible exceso de proliferación de células neurales

mientras que al mismo tiempo promueva la migración organizada de neuroblastos hacia el peri-infarto para un reemplazamiento eficiente de células muertas en el área dañada tras el ictus.

## **B. INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA NEUROGÉNESIS TRAS ICTUS ISQUÉMICO EXPERIMENTAL.**

En esta segunda parte de la Tesis Doctoral hemos explorado el papel de la edad en la neurogénesis después del ictus usando un modelo permanente de isquemia focal en ratones jóvenes y viejos.

### **La edad y la progresión del infarto**

En primer lugar, hemos encontrado que la edad no influye en el tamaño del infarto cuando éste se mide a los 2 días; sin embargo, cuando se determina a los 7 días encontramos que, mientras que en los ratones jóvenes la lesión isquémica sufre una regresión y disminuye significativamente su tamaño, este efecto no se observa en los ratones viejos, los cuales tienen infartos mayores a este tiempo. Otros estudios previos en animales viejos muestran volúmenes de infarto mayores cuando se comparan con los ratones jóvenes (Popa-Wagner et al., 2007). En concreto, estos autores describieron que los roedores viejos desarrollan mayores volúmenes de infarto que los jóvenes cuando se determina a tiempos tempranos post-ictus; sin embargo, nosotros hemos encontrado este mayor volumen a tiempos más tardíos (7 días post-ictus), tiempo en el que estos autores no encontraron diferencias significativas en el volumen de infarto. Hay distintos factores que pueden explicar esta aparente controversia, como son el modelo isquémico utilizado, la edad de los animales o que se utilicen ratas o ratones (Zhang et al., 2005; Popa-Wagner et al., 2007; Popa-Wagner et al., 2011). En este contexto, se han descrito muchos factores que podrían contribuir a la falta de regresión del infarto en animales viejos (para revisión (Popa-Wagner et al., 2011). Es importante destacar que el estado de “inflamm-aging” característico de los animales viejos y que describimos a continuación, podría participar en este defecto en la involución del daño cerebral observado.

## **Proliferación en la ZSV y edad**

En segundo lugar, nuestros resultados muestran que, en los ratones viejos y bajo condiciones isquémicas, la proliferación de la ZSV (células BrdU+) a los 7 días después del daño no depende del tamaño de infarto, como queda reflejado por la correlación negativa encontrada. Como vimos anteriormente, en los animales jóvenes sí existe una correlación positiva entre la proliferación celular y el tamaño de infarto, que se pierde pues en los animales viejos. Esta correlación negativa podría explicarse porque tanto la neurogénesis fisiológica, como la inducida por isquemia es menor en los animales viejos que en los jóvenes. En efecto, nuestros datos en animales sham-viejos muestran que la neurogénesis fisiológica está reducida, como se demuestra por un menor número de células proliferativas (BrdU+), de células madre tipo B (células prominín-1+/EGFR+/nestín+) y de células de amplificación transitoria tipo C (células prominín-1+/EGFR+/nestín-). Nuestros resultados están de acuerdo con los previamente publicados (para revisión ver (Hamilton et al., 2013). Como ya hemos comentado previamente, la participación simultánea de factores estimuladores e inhibidores de la proliferación y su afectación por la edad puede tener un papel esencial en los resultados encontrados.

Además, también hemos encontrado que la vejez reduce la proliferación de la ZSV post-ictus en los 2 tipos celulares estudiados. Se reduce tanto el número de células tipo B (prominín-1+/EGFR+/nestín+) como el número de células tipo C (prominín-1+/EGFR+/nestín-) y, en particular, aquellas que se corresponden con las células de amplificación transitoria tipo 3 descritas por Kempermann en la zona subgranular (Kempermann et al., 2004; Popa-Wagner et al., 2011). En este contexto, Jin y colaboradores describen que la neurogénesis inducida por ictus está preservada, pero reducida, en los cerebros de ratones viejos, como demuestra un menor número de células BrdU+ en la ZSV (Jin et al., 2004). Sin embargo, nuestros datos suponen la primera demostración tras ictus de que la vejez inhibe la proliferación específicamente de células tipo B y tipo C en la ZSV.

### **Migración de neuroblastos y edad**

Nuestros resultados muestran que la edad retrasa o bloquea el proceso de migración de neuroblastos de la ZSV hacia el área dañada. En nuestro estudio, examinamos la población de neuroblastos (células tipo A: Dcx+) en las tres zonas migratorias partiendo de la ZSV (Z1) a través del cuerpo calloso (Z2) hacia la zona de daño isquémico (Z3), a dos tiempos diferentes, 7 y 14 días tras ictus. Dos semanas después del infarto, observamos que la densidad de neuroblastos en las zonas Z2 y Z3 está aumentada en ratones viejos cuando se compara con la de los ratones jóvenes, sugiriendo que la edad dificulta el proceso de migración. Muchos factores podrían estar involucrados en el proceso alterado de migración que hemos visto en animales viejos. Por una parte, la propia respuesta inflamatoria acelerada encontrada en los ratones viejos en respuesta al ictus podría estar contribuyendo a la formación temprana de la cicatriz glial en el área infartada que bloquearía la migración (Badan et al., 2003b; Popa-Wagner et al., 2006). Por otra parte, se han descrito que algunos factores implicados en los procesos migratorios como EGF (Teramoto et al., 2003) y VEGF (Wittko et al., 2009) están menos expresados o incluso inhibidos durante el envejecimiento (Enwere et al., 2004; Gao et al., 2009) lo que también podría estar justificando este proceso alterado. Se requieren estudios más detallados de estos aspectos para clarificar los mecanismos implicados.

### **Diferenciación celular y edad**

Finalmente, hemos visto que los ratones viejos tienen un número muy bajo de nuevas neuronas (células BrdU+/NeuN+) en el área cortical a los 14 días tras ictus, resultados que están de acuerdo con la supresión del proceso migratorio encontrado. Además, recientemente se ha publicado que la respuesta de neurogénesis tras infartos corticales en humanos es muy pequeña, hecho que seguramente se deba a que los pacientes son muy mayores (Codega et al., 2014).

En resumen, hemos demostrado que en los animales viejos, algunos de los procesos que participan en la neurogénesis inducida por ictus se mantienen aunque globalmente ésta esté reducida, como lo demuestran la inhibición de la proliferación celular en la ZSV, la migración obstaculizada y un reducido número de nuevas neuronas en el área cortical. Por lo tanto, las medidas

destinadas a incrementar los distintos procesos de neurogénesis podrían tener importantes implicaciones terapéuticas en pacientes mayores con ictus. Más aún, nuestros resultados remarcan la importancia de usar animales viejos para el estudio del ictus.

### **Parámetros inflamatorios y edad**

Nuestros datos muestran que el grupo de animales viejos tienen una mayor proliferación de la microglía en la corteza ipsilateral como se demuestra por un incremento de las células BrdU+/Iba1+ cuando se compara con los ratones jóvenes. Pero también hemos encontrado, que los animales viejos tienen un mayor número de neutrófilos infiltrados. Nuestros resultados apoyan la existencia de un estado basal activado (*inflamm-aging*) y están de acuerdo con estudios previos que describen que el número de células BrdU+ en el hemisferio infartado de ratas viejas los días 3 y 7 tras ictus excede al de las ratas jóvenes, correspondiendo el 45% de éstas a microglía activada (Popa-Wagner et al., 2006). De acuerdo con esto, no sólo se ha descrito que la expresión basal de mRNA de CD11b e Iba1, marcadores de microglía activada, es mayor en los cerebros de las ratas viejas que en las jóvenes (Sandhir et al., 2008) sino que la vejez también intensifica la activación clásica M1, mitigando la activación alternativa M2 (Lee et al., 2013a). Como antes comentábamos, la edad está asociada con una peor recuperación después del ictus y nuestros resultados, mostrando un cambio en el equilibrio del estado de la microglía hacia la activación (*inflamm-aging*), también apoyan este aspecto. Algunos mecanismos, como la eliminación retrasada de restos celulares en animales viejos (Kotter et al., 2005) y la formación rápida de la cicatriz glial tras ictus en ratas viejas (Badan et al., 2003b) que pueden estar asociados con la rápida proliferación celular encontrada –2 días de acuerdo con los análisis por citometría de flujo–, podrían contribuir a la pobre recuperación del tejido observada en animales viejos. Por último, el mayor número de neutrófilos infiltrados encontrado en los animales viejos coincide con el concepto clásico de que un mayor daño cerebral conlleva una mayor infiltración ya comentada previamente. De nuevo, al igual que hemos comentado con los experimentos de TLR4, se requieren estudios determinando el fenotipo de las células

infiltradas (macrófagos clásicos –M1- vs alternativos M2 y neutrófilos N1 vs N2) para poder establecer de forma más precisa el mecanismo implicado.

## CONCLUSIÓN

Los mecanismos que operan en las lesiones corticales distales en animales viejos están posibilitando una serie de procesos que, en última instancia, llevarán a la peor recuperación del tejido isquémico. Estos procesos consisten en una menor proliferación en la ZSV y una mayor microgliosis e infiltración de neutrófilos que crean un ambiente inflamatorio tal que impiden que se lleven a cabo de forma normal los procesos de migración y diferenciación. De hecho, podrían estar actuando como una barrera impidiendo el paso de los neuroblastos en su migración hacia la zona infartada y, en última instancia, impedir que las nuevas neuronas puedan integrarse en la corteza peri-infarto.

En resumen, a lo largo de este trabajo hemos demostrado el papel de TLR4 en la proliferación de distintos tipos celulares, en la migración de neuroblastos y en la diferenciación neuronal después del ictus y, lo que es muy importante, las diferencias en estos procesos debidas a la edad. Muchos estudios experimentales han demostrado los efectos neuroprotectores de una alta variedad de fármacos después del ictus; sin embargo la mayoría de estos han fracasado al no mostrar beneficios en el ser humano. Una posible explicación para esta discrepancia entre los estudios experimentales y los clínicos podría ser el papel que la edad juega en la recuperación del cerebro. Nuestros resultados muestran diferentes efectos dependiendo de la edad de los animales, lo que remarca la importancia de usar animales viejos. En cualquier caso, son necesarios más estudios para examinar detenidamente el comportamiento a largo plazo y estudiar la implicación de TLR4 y de la edad sobre los procesos de neuro-reparación en este proceso tardío.





# CONCLUSIONES





## 6. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados confirman que **TLR4** está implicado en el daño cerebral agudo que se produce después de un ictus experimental.
2. **TLR4** no sólo inhibe la proliferación fisiológica en la ZSV, como estaba previamente descrito, sino que además inhibe la proliferación celular en la ZSV tras procesos de ictus. En particular, TLR4 inhibe la proliferación de las células progenitoras de amplificación transitoria tipo 3 (células tipo C) sin afectar la de las células madre tipo B.
3. **TLR4** facilita la migración de neuroblastos (células tipo A) hacia la región dañada, de forma concomitante a un aumento en el número de nuevas neuronas corticales en la zona peri-infarto.
4. **TLR4** no está implicado en los procesos de proliferación microglial cortical, aunque de forma local, su ausencia puede estar facilitando la activación microglial por efectos indirectos.
5. En ausencia de **TLR4**, se produce un aumento de la infiltración de células periféricas (neutrófilos y monocitos) en la zona del infarto, lo que sugiere que TLR4 podría estar implicado en los cambios fenotípicos de las diferentes células locales o periféricas.
6. La **edad** de los animales no influye en el tamaño del infarto de forma temprana en los modelos estudiados. Sin embargo, a tiempos más tardíos, si bien en los ratones jóvenes la lesión isquémica se reduce, este efecto no se observa en los ratones viejos, en los cuales el tamaño de infarto se mantiene.
7. Tras un daño isquémico en ratones jóvenes, pero no en viejos, la proliferación celular en la ZSV depende del tamaño del infarto.

8. La **edad** inhibe tanto la proliferación fisiológica como la proliferación celular en la ZSV que se produce tras procesos de ictus. Hemos descrito que la edad inhibe específicamente la proliferación de las células progenitoras de amplificación transitoria tipo 3 (células tipo C) y de las células madre tipo B.
9. La **edad** retrasa o bloquea el proceso de migración de neuroblastos (células tipo A) de la ZSV hacia el área dañada, de forma concomitante a una disminución del número de nuevas neuronas corticales en la zona peri-infarto.
10. La **edad** conlleva una mayor proliferación de la microglía en la corteza ipsilateral al daño isquémico, compatible con un estado inflamatorio basal activado ("*inflamm-aging*"), que puede estar participando en los procesos descritos previamente.
11. La **edad** media una mayor infiltración de neutrófilos en la zona infartada, que puede estar contribuyendo al daño cerebral tras isquemia.
12. En resumen, nuestros datos indican que el receptor **TLR4** posee un doble papel en el ictus, mediando daño cerebral en la fase aguda y promoviendo neurogénesis en la fase crónica mientras que la **edad** puede tener efectos deletéreos en ambas fases del ictus, alterando la progresión del daño cerebral y retrasando o disminuyendo la neurogénesis.



# RESUMEN





## 7. RESUMEN

En el mundo, aproximadamente 15 millones de personas sufren un ictus cada año y, con 5 millones de muertes, el ictus es la segunda causa de muerte y la primera de discapacidad a largo plazo (Macrez et al., 2011). Se estima que alrededor del 25% de la población mayor de 85 años desarrollará un ictus. Pese a sus devastadoras consecuencias a nivel mundial, hasta la fecha, el único tratamiento farmacológico aprobado es la recanalización del vaso ocluido por medio de la administración intravenosa de rt-PA (Activador del Plasminógeno Tisular Recombinante), sin embargo, debido a los criterios de inclusión, muy pocos pacientes pueden beneficiarse de este tratamiento (Albers et al., 2011). Como consecuencia, es necesario el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras y neurorreparadoras para el tratamiento en fase aguda y crónica de esta patología.

Cuando ocurre un ictus isquémico, se produce una cascada de eventos inflamatorios (cascada isquémica) que se inicia en la microvasculatura cerebral, donde el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno inducen la activación del sistema del complemento, las plaquetas y las células endoteliales (para revisión ver (Iadecola and Anrather, 2011)). A su vez, a nivel perivascular y del parénquima se produce una respuesta inmunológica innata que pone en marcha una fuerte respuesta inflamatoria. Uno de los principales tipos celulares responsables de la respuesta cerebral es la microglía, que son los macrófagos del cerebro que desencadena la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores inflamatorios, lo que se lleva a cabo – en parte – gracias a la señalización intracelular que se pone en marcha tras la activación de los receptores toll-like (TLR).

Los TLR pertenecen a una familia de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) que están asociados a patógenos (PAMPs) o a daño celular (DAMPs). Una vez reconocido el ligando, los TLRs producen mediadores inflamatorios a través de rutas de señalización intracelulares. Aunque las funciones fisiológicas de los TLRs no están bien exploradas, se ha descrito su participación en procesos como la inflamación y la neurogénesis. En el contexto de la isquemia cerebral, se sabe que TLR4 tiene un importante papel en la inducción de la respuesta inflamatoria y en la producción del daño



tisular (Caso et al., 2007). De hecho, hay distintas evidencias experimentales que demuestran que la deficiencia no sólo de TLR4 sino también de TLR2 atenúa significativamente el daño cerebral isquémico (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007). Se ha descrito que los ratones deficientes para TLR4 tienen una menor expresión de mediadores inflamatorios cuando hay daño cerebral (Caso et al., 2007). Por otra parte, se ha visto que bajos niveles de activación de TLR4 previos a una isquemia, pueden ser beneficiosos para el sistema nervioso central protegiéndolo. Este proceso se denomina preconditionamiento isquémico y está implicado en la tolerancia isquémica (Pradillo et al., 2009). En su conjunto, TLR4 puede ser considerado como una diana terapéutica en fase aguda.

Además de su papel en la respuesta inflamatoria, TLR4 participa modulando procesos implicados en la homeostasis celular como la neurogénesis adulta. La neurogénesis es el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales procedentes de precursores del SNC. En condiciones fisiológicas, existen dos nichos neurogénicos en el cerebro adulto: la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo, de la cual las nuevas neuronas migran hacia la capa de células granulares; y la zona subventricular (ZSV) que ocupa la pared externa de los ventrículos laterales del cerebro anterior, de la cual los neuroblastos migran a través de la ruta migratoria rostral al bulbo olfatorio (para revisión (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). En experimentos previos se ha demostrado que, bajo condiciones fisiológicas, TLR4 inhibe la proliferación y diferenciación neuronal (Rolls et al., 2007) en ratones adultos. Tras la isquemia cerebral la neurogénesis se mantiene y existen evidencias que confirman que los neuroblastos de la ZSV son capaces de migrar hacia la región de tejido infartado (Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003; Saha et al., 2012). Sin embargo, la función que TLR4 pueda desempeñar en la neurogénesis tras ictus isquémico se desconoce.

Por otro lado, el ictus es una enfermedad que se padece principalmente en la vejez. La edad está asociada con una reducción generalizada en la capacidad del tejido adulto para repararse a sí mismo. Pero además, la edad está asociada a una reducción en la función del sistema inmune, conocida

como “inmunosenescencia” (Chamorro et al., 2007), acoplada con una inflamación basal crónica llamada “Inflamm-aging” (Franceschi et al., 2000).

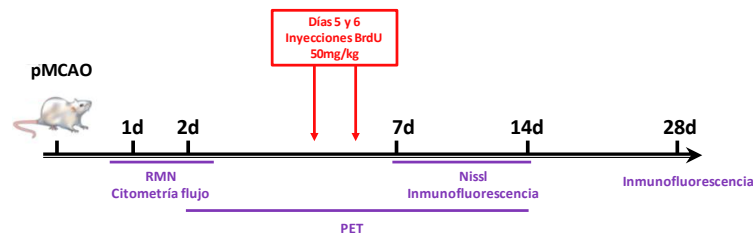
Con estos antecedentes, establecimos la siguiente **hipótesis**: el receptor TLR4 está implicado en el ictus isquémico, tanto en la fase aguda mediando el daño cerebral, como en una fase más tardía modulando los procesos de neurorreparación (neurogénesis). Estos procesos son dependientes de la edad.

Y los **objetivos** que nos planteamos para demostrar la hipótesis fueron:

- 1- Estudio de la implicación del receptor TLR4 como mediador de daño en la fase aguda y de neurorreparación en la fase crónica. Para ello, se ha llevado a cabo estudios de la implicación de TLR4 en los procesos de proliferación celular, de migración y de diferenciación tras ictus experimental. También se ha estudiado la implicación de TLR4 en la inflamación tanto a nivel central (infiltración y microgliosis en la zona de peri-infarto), como a nivel periférico (circulación sistémica).
- 2- Estudio de la influencia de la edad en el proceso de neurogénesis (proliferación, migración y diferenciación) y en la respuesta inflamatoria central y periférica.

Para poder llevar a cabo los objetivos marcados en esta tesis doctoral, se realizaron una serie de experimentos para estudiar el efecto que tienen sobre la isquemia algunos factores como la presencia o ausencia de TLR4 y la edad de los animales en los procesos de daño cerebral y de neurogénesis.

Para todos los procedimientos experimentales, utilizamos ratones C57BL/10ScNJ que no expresan TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) por una delección natural del gen; y C57BL/10J que expresa el receptor de forma normal (TLR4<sup>+/+</sup>). Los grupos de edad de los animales fueron: adultos jóvenes (2-3 meses) y adultos viejos (12-14 meses). El modelo experimental para la inducción de la isquemia focal permanente fue la oclusión de la arteria cerebral media mediante una ligadura por debajo de la bifurcación proximal o en la rama distal posterior, dependiendo del grupo. La 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU, 50mg/kg) se inyectó intraperitonealmente los días 5 y 6 tras ictus. La proliferación celular se cuantificó los días 7, 14 y 28 tras la isquemia. El diseño experimental fue el siguiente:



El procesamiento de las muestras dependió del ensayo que se iba a realizar. Así, para las muestras destinadas a inmunofluorescencia, se perfundió a los ratones con tampón fosfato 0'1M seguido de solución fijadora de paraformaldehído al 4%. Después se extrajeron los cerebros y, tras pasar 48 horas en una solución de sacarosa al 30%, se cortaron en secciones coronales de 40µm de grosor. Seguidamente, se realizaron las tinciones específicas para cada marcador y las cuantificaciones se llevaron a cabo a través de distintas técnicas de microscopía.

Por otro lado, las muestras que se utilizaron para citometría de flujo se procesaron de forma diferente. Así, se sacrificó a los animales con una sobredosis de isoflurano y se extrajeron las distintas muestras (corteza y ZSV del cerebro y sangre del corazón). Las muestras de la ZSV se sometieron a disgregación mecánica y enzimática para la obtención de una suspensión de células de esa zona. Para las células infiltradas en la corteza, se realizó un gradiente de Percoll. Por último, para las muestras de sangre simplemente fue necesario lisar las células rojas y procesar el resto.

El daño isquémico se evaluó mediante la determinación del volumen del infarto por resonancia magnética nuclear (2 días post-isquemia) o por tinción de Nissl (7 días post-isquemia). La inmunofluorescencia se cuantificó de forma diferente dependiendo del tipo celular que estuviéramos estudiando. Así, la cuantificación de BrdU en la ZSV se realizó mediante conteo estereológico (Stereoinvestigator); para la cuantificación de células corticales BrdU+, Iba1+ y NeuN+ se tomaron imágenes por microscopía confocal siguiendo los criterios establecidos para cada experimento y se contaron las células de forma individualizada. Por su parte, la cuantificación de neuroblastos (Dcx+) se realizó por z-stacks de microscopía confocal y éstos fueron posteriormente densitometrados (Image J).

Para los análisis de citometría de flujo se procedió al marcaje de las células de interés y, en todos los casos, las muestras fueron analizadas por el software FlowJo.

Por último, realizamos estudios mediante tomografía por emisión de positrones (PET) para la caracterización de procesos inflamatorios corticales y de proliferación en la ZSV usando los radiotrazadores [ $^{11}\text{C}$ ] PK11195 y [ $^{18}\text{F}$ ] FLT, respectivamente.

Todos los análisis estadísticos de los resultados fueron llevados a cabo mediante el programa PRISM 5. Se realizó una t de Student para comparar dos grupos y una ANOVA de una sola vía seguido de una prueba post-hoc de Neuman-Keuls para comparar más de dos grupos. Para los estudios de correlación se empleó un análisis de regresión lineal. Los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y una  $p < 0.05$  se asumió como estadísticamente significativa.

Los **resultados** obtenidos en esta tesis doctoral los dividimos en cuatro partes que pueden resumirse así:

#### 1. Efecto del receptor TLR4 en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental.

La oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratones nos mostró que los ratones  $\text{TLR4}^{-/-}$  tuvieron infartos significativamente más pequeños a los 2 y 7 días que los ratones  $\text{TLR4}^{+/+}$ , como ya se había descrito previamente por nuestro grupo (Caso et al., 2007). Con el fin de estudiar el papel de TLR4 sobre la proliferación celular sin que interfirieran las diferencias en el tamaño de infarto, decidimos realizar la oclusión en la rama posterior de la arteria cerebral media en los ratones  $\text{TLR4}^{+/+}$  en una localización distal. Así, obtuvimos un grupo adicional con tamaños de infarto similares a los que tenían los animales del grupo de  $\text{TLR4}^{-/-}$ .

En primer lugar, estudiamos si la proliferación celular (células BrdU+) en la ZSV era dependiente del tamaño de infarto. Nuestros resultados muestran que los animales  $\text{TLR4}^{+/+}$  presentaban una correlación positiva entre la proliferación celular en la ZSV a los 7 días y el volumen de infarto. Sin

embargo, esta correlación era negativa cuando la proliferación se medía a los 14 días.

Al estudiar el efecto de TLR4 en la proliferación celular en la ZSV tras ictus pero sin el sesgo del tamaño de infarto, vimos que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal presentaban un mayor número de células BrdU+ en la ZSV a los 7 días post-ictus que el grupo TLR4<sup>+/+</sup> de oclusión distal. También caracterizamos por citometría de flujo los diferentes tipos celulares presentes en la zona subventricular 1 y 2 días post-isquemia y el análisis reveló que mientras que en la población *prominina1+/EGFR+/nestina+* (células madre neurales o tipo B) no se observaron diferencias entre grupos, vimos que sí las había en la población *prominina1+/EGFR+/nestina-* (células progenitoras neurales de amplificación transitoria o células tipo C). Concretamente, encontramos que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> tenían mayor número de células de esta población comparado con los TLR4<sup>+/+</sup> los días 1 y 2 tras ischemia y, curiosamente, vimos el mismo efecto en los animales sham. Finalmente, mediante estudios PET utilizando el radiotrazador [<sup>18</sup>F] FLT que fue administrado a los animales los días 2, 7 y 14 tras la ischemia, vimos que los valores de captación del radioligando aumentan en el grupo de ratones TLR4<sup>-/-</sup> a los 2 y 7 días post-ischemia confirmando los resultados previamente obtenidos. Este efecto se pierde a los 14 días.

Una vez comprobado el efecto de TLR4 en la proliferación en la ZSV, evaluamos su contribución en la migración de neuroblastos desde la ZSV a la zona infartada. Para ello, evaluamos la distribución de neuroblastos en tres zonas consecutivas desde la ZSV (Z1) siguiendo por el cuerpo calloso (Z2) hasta zonas corticales cercanas a la zona infartada (Z3). Al comparar los grupos que no presentaban diferencias en el volumen de infarto (TLR4<sup>+/+</sup> oclusión distal y TLR4<sup>-/-</sup> oclusión proximal), no encontramos diferencias en el número de neuroblastos (Dcx+) en las Z1 y Z2 a los 7 días. Sin embargo, el número de neuroblastos en Z3 fue mayor en los ratones TLR4<sup>+/+</sup> con oclusión distal que en TLR4<sup>-/-</sup> con oclusión proximal, sugiriendo una migración más rápida en estos animales. Curiosamente, el número de neuroblastos en todas las zonas migratorias estudiadas a los 14 días aumentó en los TLR4<sup>-/-</sup> en comparación con los animales TLR4<sup>+/+</sup>. Estos resultados sugieren que, en el

cerebro de los ratones TLR4<sup>+/+</sup>, los neuroblastos migran más rápido hacia el área dañada, sugiriendo que la migración está obstaculizada en los animales TLR4<sup>-/-</sup>.

Finalmente, quisimos comprobar si TLR4 participaba en la formación de nuevas neuronas (BrdU+/NeuN+) en la corteza peri-infarto. En este sentido, nuestros resultados muestran que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> presentan un menor número de células BrdU+/NeuN+ tanto a 14 como a 28 días de la isquemia cerebral en comparación con los grupos de ratones TLR4<sup>+/+</sup> con oclusión distal.

## 2. Efecto del receptor TLR4 en la inflamación tras ictus isquémico experimental.

Estudiamos la proliferación microglial en la corteza y observamos un aumento en el número de células tanto Iba1+ como BrdU+/Iba1+ en el área de peri-infarto a los 7 días de producirse la lesión, en todos los grupos isquémicos estudiados en comparación con los grupos sham. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia entre los ratones isquémicos TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>. Posteriormente realizamos estudios PET utilizando el radiotrazador [<sup>11</sup>C] PK11195 que fue administrado a los animales los días 2, 7 y 14 tras la isquemia, vimos que los valores de captación del radioligando aumentan en el grupo de ratones isquémicos confirmando los resultados previamente obtenidos.

Después, evaluamos el efecto del receptor TLR4 en el reclutamiento de los leucocitos en la zona infartada del cerebro. A este respecto, nuestros resultados muestran que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> presentan un incremento en la infiltración de neutrófilos y de monocitos 1 día tras isquemia en comparación con el grupo de ratones TLR4<sup>+/+</sup>. En cambio, los niveles de linfocitos no muestran diferencias significativas entre los grupos de interés.

## 3. Efecto de la edad en la neurogénesis tras ictus isquémico experimental.

El primer aspecto que nos interesaba conocer era si la edad tenía un efecto sobre el tamaño del infarto. Nuestros resultados muestran, como cabía esperar, que los animales con oclusión proximal tuvieron tamaños de infarto significativamente mayores que los grupos de oclusión distal. Tras la oclusión proximal, observamos una regresión de la lesión similar en ambos grupos (jóvenes y viejos) al comparar los volúmenes obtenidos a los 2 y 7 días tras el

ictus. Sin embargo, después de la oclusión distal, el área infartada en el grupo de animales viejos no sufrió esta disminución a los 7 días, aunque sí en el grupo de animales jóvenes. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la evolución del infarto depende del tamaño de la lesión inicial y de la edad de los animales.

Con el fin de establecer el efecto de la edad en la neurogénesis tras la isquemia cerebral, de manera similar a lo realizado previamente para los animales jóvenes, estudiamos la proliferación en la ZSV. Habíamos visto que los ratones jóvenes mostraban una correlación positiva entre el tamaño del infarto y la proliferación en la ZSV, pero en los grupos de animales viejos, esta correlación se pierde. Nuestros datos demuestran que los animales viejos no presentan modificada la proliferación celular (células BrdU+) en la ZSV, 7 y 14 días después de MCAO distal cuando se compara con el grupo de animales jóvenes. Sin embargo, en los grupos sham, los animales viejos mostraron menor número de células proliferativas (células BrdU+) en la ZSV a los 7 días, como previamente se ha descrito para condiciones fisiológicas. También caracterizamos por citometría de flujo los diferentes tipos celulares presentes en la ZSV, 1 y 2 días post-isquemia y el análisis mostró que los animales viejos tanto a nivel fisiológico (animales sham) como tras isquemia presentan un menor número de células tipo B (*prominina1+/EGFR+/nestina+*) como de células tipo C (*prominina1+/EGFR+/nestina-*).

También exploramos el efecto de la edad sobre la población de neuroblastos (células tipo A; *Dcx+*) en la zona subventricular (Z1) y en las zonas migratorias contiguas a lo largo del cuerpo calloso (Z2 y Z3) en dirección a la corteza isquémica, a los 7 y 14 días tras el ictus. A los 14 días de la isquemia, la densidad de neuroblastos en las Z2 y Z3 fue mayor en los animales viejos cuando se compara con los jóvenes, sugiriendo o una mayor migración o una migración retenida y acumulada en estos animales. Por último, nuestros datos muestran que los animales viejos, pese a mostrar mayor número de neuroblastos en las zonas migratorias estudiadas, presentaban menor número de nuevas neuronas (células BrdU+/NeuN+) que los animales jóvenes en la zona peri-infarto a los 14 días tras isquemia.

#### 4. Efecto de la edad en la inflamación tras ictus isquémico experimental.

En los estudios de proliferación microglial de la corteza, observamos que los grupos de animales viejos mostraron mayor número de células BrdU+ y BrdU+/Iba1+ en el peri-infarto que los animales jóvenes a los 7 días post-isquemia (40% más de células BrdU+ y 60% BrdU+/Iba1+ en viejos frente a jóvenes). Al estudiar las poblaciones de leucocitos infiltrados en el parénquima de la zona infartada, vimos que había más infiltración de neutrófilos en los animales viejos de oclusión distal, 1 día después del ictus.

### CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados confirman que **TLR4** está implicado en el daño cerebral agudo que se produce después de un ictus experimental.
2. **TLR4** no sólo inhibe la proliferación fisiológica en la ZSV, como estaba previamente descrito, sino que además inhibe la proliferación de células tipo C sin afectar las de tipo B en la ZSV tras procesos de ictus. Además, **TLR4** facilita la migración de neuroblastos (células tipo A) hacia la región dañada, de forma concomitante a un aumento en el número de nuevas neuronas corticales en la zona peri-infarto.
3. **TLR4** no está implicado en los procesos de proliferación microglial cortical. Sin embargo, en ausencia de **TLR4**, se produce un aumento de la infiltración de células periféricas (neutrófilos y monocitos) en la zona del infarto.
4. El tamaño de infarto no se ve afectado por la **edad** a tiempos tempranos después de la ischemia; sin embargo, a tiempos más tardíos, mientras que en los ratones jóvenes la lesión isquémica se reduce, esto no se observa en animales viejos, en los que la lesión sigue siendo grande.
5. Tras un daño isquémico en ratones jóvenes, pero no en viejos, la proliferación celular en la ZSV depende del tamaño del infarto.
6. La **edad** inhibe tanto la proliferación fisiológica como la proliferación de células tipo B y C en la ZSV que se produce tras procesos de ictus. La **edad** retrasa o bloquea el proceso de migración de neuroblastos (células tipo A) de la ZSV hacia el área dañada, de forma concomitante a una disminución del número de nuevas neuronas corticales en la zona peri-infarto.



7. La **edad** conlleva una mayor proliferación de la microglía en la corteza ipsilateral al daño isquémico, compatible con un estado inflamatorio basal activado (*"inflamm-aging"*) y media una mayor infiltración de neutrófilos en la zona infartada
8. En resumen, nuestros datos indican que el receptor **TLR4** posee un doble papel en el ictus, mediando daño cerebral en la fase aguda y promoviendo neurogénesis en la fase crónica mientras que la **edad** puede tener efectos deletéreos en ambas fases del ictus, alterando la progresión del daño cerebral y retrasando o disminuyendo la neurogénesis.

# SUMMARY





## 8. SUMMARY

Worldwide, approximately 15 million people suffer a stroke each year and, with 5 million deaths, stroke is the second cause of death and the first long-term disability (Macrez et al., 2011). It is estimated that about 25 % of the population over 85 years will develop a stroke. Despite its devastating consequences worldwide, to date, the only approved drug treatment is recanalization of the occluded vessel through intravenous administration of rt-PA (Recombinant Tissue Plasminogen Activator). However, because of the restricted inclusion criteria, few patients may benefit from this treatment (Albers et al., 2011). Consequently, it is imperative the development of new neuroprotective and neurorepair therapies for the treatment in acute and chronic phase of this disease.

From minutes to hours after the onset of an ischemic stroke, a cascade of inflammatory events (ischemic cascade) is initiated in the cerebral microvasculature, where oxidative stress and reactive oxygen species induce the activation of the complement system, platelets and endothelial cells (Iadecola and Anrather, 2011). One of the major cell types responsible for brain inflammatory response is the microglia, which are brain resident macrophages. These cells trigger the inflammatory response through the production of inflammatory mediators, which is carried out by intracellular signalling initiated by the toll-like receptors (TLR).

TLRs are a family of pattern recognition receptors (PRR) responsible for the identification of conserved pathogen (PAMPs) or cell damage-associated molecular patterns (DAMPs). Once the ligand is bound and recognized, TLRs induce the expression of inflammatory mediators via intracellular signalling pathways. Although the physiological functions of TLRs are not well explored, their participation in processes such as inflammation and neurogenesis has been described. In the context of brain ischemia, it is known that TLR4 has important roles in the induction of the inflammatory response and in production of tissue damage (Caso et al., 2007). In fact, there is experimental evidence showing that not only TLR4 but also TLR2 deficiency significantly attenuates ischemic brain damage (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007).

It has been reported that mice deficient for TLR4 have a reduced expression of inflammatory mediators after a brain ischemic insult (Caso et al., 2007). Likewise it has been found that low levels of TLR4 activation are beneficial to the central nervous system leading to phenomenon known as ischemic preconditioning, a process in which TLR4 has been demonstrated to participate (Pradillo et al., 2009). Altogether, TLR4 might be considered as a therapeutic target in the acute phase of stroke.

In addition to its role in the inflammatory response, TLR4 participates modulating processes involved in cellular homeostasis, such as in adult neurogenesis. Neurogenesis is the process of generating new functional neurons from precursors in the CNS. Under physiological conditions, there are two neurogenic niches in the adult brain: in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus of the hippocampus, in which new neurons migrate to the granule cell layer and the subventricular zone (SVZ) occupying the outer wall of the lateral ventricles of the forebrain, from where neuroblasts migrate through the rostral migratory route to the olfactory bulb (for review (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Recent experiments have shown that, under physiological conditions, TLR4 inhibits proliferation and neuronal differentiation (Rolls et al., 2007) in adult mice. After brain ischemia, a large number of neuroblasts from SVZ are able to overcome the tight regulation that exists to leave its normal route and migrate to the region of infarcted tissue (Zhang et al., 2001; Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003; Saha et al., 2012). But the role that TLR4 may play in neurogenesis after ischemic stroke is unknown.

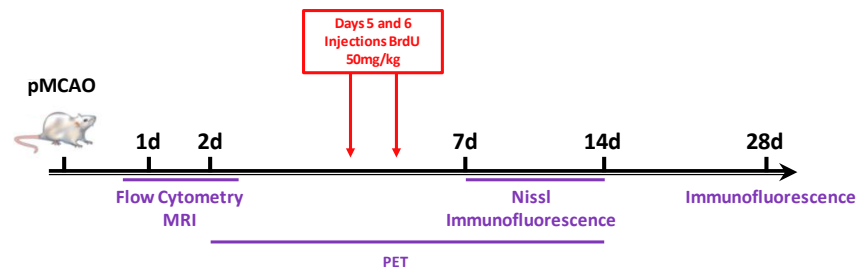
In addition, stroke is a disease that mainly affects aged patients, a condition associated with a general reduction in the ability of adult tissue for self-repair. In this context, the brains of aged mice are characterized by a reduced function of the immune system, known as "immune-senescence" (Chamorro et al., 2007), coupled with a chronic basal inflammation called "inflamm-aging" (Franceschi et al., 2000).

With this background, we established the following **hypothesis**: TLR4 receptor is involved in ischemic brain damage, both in mediating the acute damage, as in a later phase modulating processes of neurorepair (neurogenesis); and this involvement is age dependent.

The **aims** we set to test the hypothesis were:

- 1 - Study of the involvement of the TLR4 receptor both in mediating acute damage, as in a later phase modulating processes of neurorepair. For this, we have carried out the study of the involvement of TLR4 in inflammation both at peripheral (systemic circulation) and central level (infiltration and microgliosis in the peri-infarct zone) after ischemic stroke. We also studied the role of TLR4 in the process of neurogenesis by determining cell proliferation, migration and differentiation.
- 2 - Study of the influence of age in both acute damage (local and central inflammation), as in a later phase modulating processes for neurorepair (proliferation, migration and differentiation).

To carry out the objectives set in this doctoral thesis, we designed a series of experiments in order to study the effect of the presence or absence of TLR4 and the age of the animals in the processes of brain damage and neurogenesis after ischemia. For all experimental procedures, we used C57BL/10ScNJ mice that do not express TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) because of a natural deletion of the gene; and C57BL/10J expressing the receptor normally (TLR4<sup>+/+</sup>). The groups of age of the animals were: young adults (2-3 months) and aged adults (12-14 months). The experimental model for the induction of permanent focal ischemia was the occlusion of the middle cerebral artery by a ligature in the trunk just before its bifurcation between the frontal and parietal branches (proximal occlusion). In order to obtain smaller infarct volumes and thus to avoid the bias due to different infarct size on the end-points of the study, we included an additional group in which MCAO was performed on a posterior branch on the MCA of TLR4<sup>+/+</sup> mice (distal occlusion). 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg) was injected intraperitoneally once daily from days 5 to 6 after ischemia. Cell proliferation was quantified 7, 14 and 28 days after ischemia. The experimental design was as follows:



The processing of samples depended on the trial that we were going to carry out. Thus, for the samples for immunofluorescence, we perfused the mice with 0.1 M phosphate buffer followed by fixative solution of 4% paraformaldehyde. Then the brains were removed and, after 48 hours in a solution of 30% sucrose, brains were cut into coronal sections of 40µm thickness. Next, we used the specific dyes for each marker of interest and the quantifications were performed through various microscopic techniques.

On the other hand, samples that were used for flow cytometry were processed differently. Thus, animals were sacrificed with an overdose of isoflurane and the different samples (cortex and SVZ from brain and blood from heart) were removed. SVZ samples underwent mechanical and enzymatic digestion to obtain a cell suspension of each zone. For infiltrating cells in the cortex, a Percoll gradient was performed. For blood samples it was necessary to lyse the red cells before.

Ischemic damage was assessed by determination of infarct volume by magnetic resonance imaging (2 days post-ischemia) or by Nissl staining (7 days post-ischemia). Immunofluorescence was quantified differently depending on the cell type that we were studying. Thus, quantification of BrdU in SVZ was performed using stereological counting (Stereoinvestigator ); for counting BrdU+, Iba1+ and NeuN+ cortical cells, images were taken by confocal microscopy following the criteria established for each experiment and cells were counted individually. On the other hand, the quantification of neuroblasts (Dcx+) was made by z-stacks obtained by confocal microscopy, and the densitometry were subsequently calculated (Image J).

For flow cytometric analysis, we proceeded to label the cells of interest and, in all cases, the samples were analyzed by FlowJo software.



Finally, we carried out positron emission tomography (PET) for the characterization of cortical inflammatory processes and the proliferation in SVZ using the radiotracers [ $^{11}\text{C}$ ] PK11195, and [ $^{18}\text{F}$ ] FLT, respectively.

All statistical analyses of the results were performed using Prism 5 software. Student t-test was performed to compare two groups and ANOVA one-way followed by a post hoc Neuman-Keuls test to compare more than two groups. For correlation studies linear regression analysis was used. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and  $p < 0,05$  was assumed as statistically significant.

The **results** obtained in this thesis are divided into four parts that can be summarized as:

#### 1. Effect of TLR4 receptor in neurogenesis after experimental ischemic stroke.

The permanent occlusion of the middle cerebral artery in mice showed that TLR4<sup>-/-</sup> had significantly smaller infarct size at 2 and 7 days after injury than TLR4<sup>+/+</sup> mice. To study the role of TLR4 on cell proliferation without interference of the differences in infarct size, we performed the occlusion of the posterior branch of the middle cerebral artery in TLR4<sup>+/+</sup> mice in a distal location. Thus, we obtained an additional group with infarct sizes similar to those found in TLR4<sup>-/-</sup> animals.

First, we examined whether cell proliferation (BrdU+) in the SVZ was dependent on the infarct size. Our results show that TLR4<sup>+/+</sup> animals showed a positive correlation between cell proliferation in the SVZ at 7 days and infarct volume. However, this correlation was negative when the proliferation was measured at day 14.

Second, our data demonstrate that the presence of TLR4 inhibits SVZ cell proliferation after MCAO, as demonstrated by a decreased number of BrdU+ cells in the ipsilateral SVZ, determined 7 days after the ischemic insult, when compared with the TLR4<sup>-/-</sup> group with similar infarct size. In order to confirm this finding and to establish the nature of the cells present in the SVZ, we also characterized by flow cytometry the different cell types present in this area at earlier times, 1 and 2 days after MCAO. First, our results show the



presence of two major cell populations: i) a prominin-1+/EGFR+/nestin+ cell subset, corresponding to the primary neural stem cells (astrocyte-like type-B cells), and ii) a prominin-1+/EGFR+/nestin- cell subset, consistent with the transit-amplifying cells (type-C cells). Importantly, whereas in the prominin-1+/EGFR+/nestin+ population there were no differences between groups, TLR4<sup>+/-</sup> mice showed a smaller number of prominin-1+/EGFR+/nestin- cells than the TLR4<sup>-/-</sup> mice after MCAO, and also than its own sham condition, suggesting an inhibitory role of TLR4 in the proliferation of type-C cells after stroke. Furthermore, studies by PET, using the radiotracer [18F] FLT that was administered to animals on days 2, 7 and 14 after ischemia, we have found that the values of radioligand uptake were increased in the group of TLR4<sup>-/-</sup> mice at 2 and 7 days post-ischemia, confirming the results previously obtained.

Third, we explored the effect of TLR4 on the neuroblast population (type-A cells) in 3 migratory zones ranging from the SVZ (Z1) through the corpus callosum (Z2) toward the damaged area (Z3), 7 and 14 days after the ischemic insult. We found that the density of neuroblasts (DCX+ cells) in Z3, but not in Z1 and Z2, was higher in TLR4<sup>+/-</sup> when compared with TLR4-deficient mice 7 days after MCAO, consistent with a faster migration process in TLR4<sup>+/-</sup> animals. Importantly, 14 days after MCAO, the density of DCX+ cells in all the migratory zones studied increased in TLR4-deficient mice when compared with the TLR4<sup>+/-</sup> ones. These results suggest that, in TLR4<sup>+/-</sup> mouse brain, neuroblasts migrate faster towards the injured area, whereas a hampered migration is found in TLR4-deficient animals. In sham-operated mice, neuroblasts density was smaller than that present after MCAO in both groups of mice.

Finally, we have studied the number of adult differentiated neurons (BrdU+/NeuN+ cells) in the ipsilesional cortex at 14 and 28 days after the ischemic insult. Interestingly, we found that the presence of TLR4 increased the number of BrdU+/NeuN+ cells, at both 14 and 28 days, when compared with the group of TLR4<sup>-/-</sup> mice. These results demonstrate that, despite reduced SVZ cell proliferation, the number of new neurons that reach the peri-infarct cortex is increased in TLR4<sup>+/-</sup> mice. No new neurons (BrdU+/NeuN+) were found in the cortex of sham-operated mice.

## 2. Effect of TLR4 receptor in inflammation after experimental ischemic stroke.

When we studied microglial proliferation in the cortex, we observed an increase in the number of both Iba1+ and BrdU+/Iba1+ cells in the peri-infarct area at 7 days of the injury in all the ischemic groups studied compared with sham groups. However, we did not find any difference between TLR4<sup>+/+</sup> and TLR4<sup>-/-</sup> mice. PET imaging showed that the standard values of [<sup>11</sup>C] PK11195 radiotracer uptake increased in all the ischemic groups when compared with the sham-groups as observed by immunofluorescence.

Then we evaluated the effect of TLR4 in circulating leukocytes following cerebral ischemia. We observed that the population of neutrophils in the TLR4<sup>-/-</sup> ischemic mice was increased 1 day after ischemia when compared with TLR4<sup>+/+</sup> mice. We also studied the effect of the TLR4 receptor in the recruitment of leukocytes in the infarcted brain area. In this regard, our results show that TLR4<sup>-/-</sup> mice have an increase in neutrophil and monocyte infiltration 1 day after ischemia compared with TLR4<sup>+/+</sup> mice. In contrast, lymphocyte levels did not present any significant differences between the groups of interest.

## 3. Effect of age on neurogenesis after experimental ischemic stroke.

We first studied whether age had an effect on infarct size. First, and as expected, animals with proximal occlusion presented a lesion size significantly larger than the distal occlusion infarct groups. After proximal occlusion, we also found a similar evolution of infarction towards a decrease in both groups (young and aged) measured from 2 to 7 days after stroke. However, after distal occlusion, the infarcted area in the group of aged animals did not decrease at 7 days compared with the group of young animals. These results indicate that the infarct evolution depends on the size of the initial lesion and on the age of the animals.

Since we have reported that SVZ cell proliferation depends on infarct size after stroke in young mice, we decided to study whether this effect is also observed in aged mice, by including an additional group of mice in which MCAO was performed proximally in order to obtain different lesion volumes. When we studied SVZ cell proliferation (BrdU<sup>+</sup> cells) at 7 days after stroke in the groups of

aged animals (proximal and distal occlusion), we did not find any correlation between infarct size and cell proliferation determined at the ipsilateral SVZ 7 d after injury.

In order to ascertain the effect of aging on SVZ cell proliferation, we first studied the number of BrdU<sup>+</sup> cells in this area 7 and 14 days after MCAO, after a pulse of BrdU at days 5-6 days. Exposure to distal MCAO did not significantly affect the number of BrdU<sup>+</sup> cells in the SVZ, either in young or in aged mice. However, in sham-operated groups, aged animals showed a lower number of proliferative cells in the SVZ (BrdU<sup>+</sup> cells). In order to confirm this finding and to establish the nature of the cells present in the SVZ, we also characterized by flow cytometry the different cell types present in this area at earlier times. Importantly, we found that aged mice showed a smaller number of both cell populations (type B and C cells) not only under physiological conditions (sham-group) but also after ischemia.

We next explored the effect of aging on the neuroblast population (type-A cells). We did not find any difference in the density of neuroblasts (DCX<sup>+</sup> cells) when young and aged mice were compared 7 days after MCAO. Importantly, 14 days after MCAO, the density of DCX<sup>+</sup> cells in Z2 and Z3 was higher in aged mice when compared with the young ones, suggesting an impairment in migration caused by aging. Finally, we have studied the number of mature differentiated neurons (BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> cells) in the ipsilesional cortex 14 days after the ischemic insult. Interestingly, we found that the number of BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> cells in the peri-infarct cortex was higher in young than in aged mice 14 days after MCAO.

#### 4. Effect of age on inflammation after experimental ischemic stroke.

Regarding microglial proliferation in cortex, we observed that brains of aged animals had a higher number of BrdU<sup>+</sup> cells and BrdU/Iba1<sup>+</sup> cells in the ischemic boundary when compared with the young mice 7 days after MCAO (40% BrdU<sup>+</sup> and 60% BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>). Regarding infiltrated neutrophils, analyzed by flow cytometry 1 day after distal MCAO, we found that their number was higher in aged than in young mice.

## CONCLUSIONS

1. Our results confirm that **TLR4** is involved in acute brain damage that occurs after experimental stroke.
2. **TLR4** not only inhibits physiological proliferation in the SVZ, as previously described, but also inhibits the proliferation of type C cells without affecting type B, in the SVZ after stroke. Furthermore, TLR4 facilitates migration of neuroblasts (type A cells) to the damaged region, concomitantly with an increase in the number of new cortical neurons in the peri-infarct zone.
3. **TLR4** is not involved in the processes of cortical microglial proliferation. However, in the absence of TLR4, increased infiltration of peripheral cells (neutrophils and monocytes) in the infarct zone occurs.
4. Infarct size is not affected by **age** at early times after the occlusion; however, at later times, whereas young mice undergo a reduction in lesion size, this is not observed in aged animals, in which the lesion remains large.
5. SVZ cell proliferation depends on infarct size in young but no aged mice after stroke.
6. **Aging** inhibits both physiological proliferation and proliferation of type B and C cells in the SVZ after stroke. Aging also delays or blocks migration of neuroblasts (type A cells) from the SVZ to the damaged area, concomitantly with a decrease in the number of new neurons in the cortical peri-infarct zone.
7. **Aging** leads to microglial proliferation in the ipsilateral cortex to the ischemic damage causing an activated basal status ("inflamm-aging") and increases neutrophil infiltration in the infarct area.
8. In summary, our data indicate that **TLR4** has a dual role in stroke, mediating brain damage in the acute phase and promoting neurogenesis in the chronic phase, whereas **aging** may have deleterious effects on both phases of stroke, modifying the progression of brain damage and delaying or decreasing neurogenesis.



# BIBLIOGRAFÍA





## 9. BIBLIOGRAFÍA

- (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581-1587.
- (STAIR) STAIR (1999) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30:2752-2758.
- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15983-15988.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-787.
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29:4408-4419.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, Gorelick PB, Hurn P, Liebeskind DS, Nogueira RG, Saver JL, Consortium SV (2011) Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke* 42:2645-2650.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127-1128.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Ao L, Zou N, Cleveland JC, Fullerton DA, Meng X (2009) Myocardial TLR4 is a determinant of neutrophil infiltration after global myocardial ischemia: mediating KC and MCP-1 expression induced by extracellular HSC70. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H21-28.
- Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, Tersteeg C, Hoefer IE, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP (2010) Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 121:80-90.



- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14:10-18.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725.
- Auriel E, Bornstein NM (2010) Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. *J Cell Mol Med* 14:2200-2202.
- Badan I, Platt D, Kessler C, Popa-Wagner A (2003a) Temporal dynamics of degenerative and regenerative events associated with cerebral ischemia in aged rats. *Gerontology* 49:356-365.
- Badan I, Buchhold B, Hamm A, Gratz M, Walker LC, Platt D, Kessler C, Popa-Wagner A (2003b) Accelerated glial reactivity to stroke in aged rats correlates with reduced functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:845-854.
- Ballesteros I, Cuartero MI, Pradillo JM, de la Parra J, Pérez-Ruiz A, Corbí A, Ricote M, Hamilton JA, Sobrado M, Vivancos J, Nombela F, Lizasoain I, Moro MA (2014) Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPAR $\gamma$  and 5-LO-dependent pathways. *J Leukoc Biol* 95:587-598.
- Bar-Shavit Z (2008) Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity* 41:195-203.
- Baron JC (2001) Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:2-8.
- Becker KJ (2009) Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. *Neuroscience* 158:1090-1097.
- Bejot Y, Caillier M, Ben Salem D, Couvreur G, Rouaud O, Osseby GV, Durier J, Marie C, Moreau T, Giroud M (2008) Ischaemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1344-1348.
- Beutler B, Eidenschenk C, Crozat K, Imler JL, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S (2007) Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat Rev Immunol* 7:753-766.
- Bode JG, Ehrling C, Häussinger D (2012) The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 24:1185-1194.

- Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021.
- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M (2002) Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* 33:586-592.
- Cao CX, Yang QW, Lv FL, Cui J, Fu HB, Wang JZ (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 353:509-514.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Catania A, Lonati C, Sordi A, Gatti S (2009) Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells. *Brain Behav Immun* 23:877-884.
- Cayre M, Canoll P, Goldman JE (2009) Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 88:41-63.
- Chamorro A, Urra X, Planas AM (2007) Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke* 38:1097-1103.
- Chamorro A, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R (2012) The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8:401-410.
- Chen MK, Guilarte TR (2008) Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1-17.
- Chen PH, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D (2012a) Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther* 18:452-456.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD (2012b) Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci* 32:11706-11715.
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA (2004) Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx* 1:36-45.

- Chiba T, Umegaki K (2013) Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke. *Mediators Inflamm* 2013:759103.
- Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, Yada M, Pohlman TH, Verrier ED (2004) Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 128:170-179.
- Christie KJ, Turnley AM (2012) Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci* 6:70.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F (2014) Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* 82:545-559.
- Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:399-418.
- Conover JC, Shook BA (2011) Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging Dis* 2:49-63.
- Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí AL, Lizasoain I, Moro MA (2013) N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPAR $\gamma$  Agonist Rosiglitazone. *Stroke*. 44(12):3498-508
- Członkowska A, Cyrta B, Korlak J (1979) Immunological observations on patients with acute cerebral vascular disease. *J Neurol Sci* 43:455-464.
- Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z (2005) Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 36:1790-1795.
- del Zoppo GJ (2006) Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med* 354:553-555.
- DiNapoli VA, Huber JD, Houser K, Li X, Rosen CL (2008) Early disruptions of the blood-brain barrier may contribute to exacerbated neuronal damage and prolonged functional recovery following stroke in aged rats. *Neurobiol Aging* 29:753-764.
- Ding Y, Subramanian S, Montes VN, Goodspeed L, Wang S, Han C, Teresa AS, Kim J, O'Brien KD, Chait A (2012) Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1596-1604.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.

- Doetsch F, Alvarez-Buylla A (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Drapeau E, Nora Abrous D (2008) Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell* 7:569-589.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13632-13637.
- Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ (2003) An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol* 139:93-101.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S (2004) Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci* 24:8354-8365.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.
- Esmaeili A, Dadkhahfar S, Fadakar K, Rezaei N (2012) Post-stroke immunodeficiency: effects of sensitization and tolerization to brain antigens. *Int Rev Immunol* 31:396-409.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
- Fassbender K et al. (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:203-205.
- Fisher M, Albers GW (2013) Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke. *Ann Neurol* 73:4-9.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908:244-254.
- Fukagawa H, Koyama T, Kakuyama M, Fukuda K (2013) Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth* 27:93-97.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.

- Gao P, Shen F, Gabriel RA, Law D, Yang E, Yang GY, Young WL, Su H (2009) Attenuation of brain response to vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and neurogenesis in aged mice. *Stroke* 40:3596-3600.
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40:1849-1857.
- Gemma C, Bachstetter AD (2013) The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci* (22);7:229.
- Ginsberg MD (2009) Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke* 40:S111-114.
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32:593-604.
- Greenberg DA, Jin K (2005) From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438:954-959.
- Guan QH, Pei DS, Liu XM, Wang XT, Xu TL, Zhang GY (2006) Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. *Brain Res* 1092:36-46.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-881.
- Haeusler KG, Schmidt WU, Foehring F, Meisel C, Guenther C, Brunecker P, Kunze C, Helms T, Dirnagl U, Volk HD, Villringer A (2012) Immune responses after acute ischemic stroke or myocardial infarction. *Int J Cardiol* 155:372-377.
- Hagg T (2005) Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci* 28:589-595.
- Hamilton LK, Joppé SE, M Cocharde L, Fernandes KJ (2013) Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. *Eur J Neurosci* 37:1978-1986.
- Hanger C, Fletcher V, Fink J, Sidwell A, Roche A (2007) Improving care to stroke patients: adding an acute stroke unit helps. *N Z Med J* 120:U2450.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.

- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- Hernández-Jiménez M, Hurtado O, Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Pradillo JM, McBurney MW, Lizasoain I, Moro MA (2013) Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke* 44:2333-2337.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hoyer S (1987) Ischemia in aged brain. *Gerontology* 33:203-206.
- Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16:735-743.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, Gao Y, Chen J (2012a) Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43:3063-3070.
- Hu X, Liu G, Hou Y, Shi J, Zhu L, Jin D, Peng J, Zhao Y (2012b) Induction of M2-like macrophages in recipient NOD-scid mice by allogeneic donor CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 9:464-472.
- Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ (2000) Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155-2159.
- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenbark AA, Offner H (2007) T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1798-1805.
- Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 25:683-692.
- Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, Shimazawa M, Tanaka H, Uematsu S, Akira S, Inagaki N, Nagai H, Hara H (2010) Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 171:258-267.
- Iadecola C (2013) The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80:844-866.
- Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17:796-808.

- Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ (2004) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18117-18122.
- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32:1208-1215.
- Jin JJ, Kim HD, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2008) Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 29;5:23.
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4710-4715.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA (2003) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci* 24:171-189.
- Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao XO, Wang Y, Simon RP, Greenberg DA (2004) Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 3:373-377.
- Jin R, Yang G, Li G (2010) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87:779-789.
- Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E (2013) TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 93:847-863.
- Kagan JC, Medzhitov R (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955.
- Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9:361-368.
- Kaiser O, Aliuos P, Wissel K, Lenarz T, Werner D, Reuter G, Kral A, Warnecke A (2013) Dissociated neurons and glial cells derived from rat inferior colliculi after digestion with papain. *PLoS One* 8:e80490.
- Kalladka D, Muir KW (2014) Brain repair: cell therapy in stroke. *Stem Cells Cloning* 7:31-44.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.

- Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF (2013) Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci* 30;7:3.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
- Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637-650.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kolominsky-Rabas PL, Weber M, Gefeller O, Neundorfer B, Heuschmann PU (2001) Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* 32:2735-2740.
- Kondo T, Kawai T, Akira S (2012) Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol* 33:449-458.
- Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN (2004) The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics* 19:143-150.
- Kotter MR, Zhao C, van Rooijen N, Franklin RJ (2005) Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiol Dis* 18:166-175.
- Laflamme N, Rivest S (2001) Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15:155-163.
- LaFrance-Corey RG, Howe CL (2011) Isolation of brain-infiltrating leukocytes. *J Vis Exp*.
- Lai AY, Todd KG (2006) Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol* 84:49-59.
- Lathia JD, Okun E, Tang SC, Griffioen K, Cheng A, Mughal MR, Laryea G, Selvaraj PK, French-Constant C, Magnus T, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like



receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 28:13978-13984.

Lee DC, Ruiz CR, Lebson L, Selenica ML, Rizer J, Hunt JB, Jr., Rojiani R, Reid P, Kammath S, Nash K, Dickey CA, Gordon M, Morgan D (2013a) Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system. *Neurobiol Aging* 34:1610-1620.

Lee H, Lee S, Cho IH, Lee SJ (2013b) Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr Protein Pept Sci* 14:33-42.

Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, Lo EH (2006) Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* 26:3491-3495.

Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22:2478-2486.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.

Li J, Wang X, Zhang F, Yin H (2013) Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases. *Pharmacol Ther* 138:441-451.

Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T, Veltkamp R (2009) Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 15:192-199.

Liew FY (2002) T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2:55-60.

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR (1998) Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18:7768-7778.

Liu X, Ye R, Yan T, Yu SP, Wei L, Xu G, Fan X, Jiang Y, Stetler RA, Liu G, Chen J (2014) Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. *Prog Neurobiol* 115C:92-115.

Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.

- Ma Y, Haynes RL, Sidman RL, Vartanian T (2007) TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle* 6:2859-2868.
- Macrez R, Ali C, Toutirais O, Le Mauff B, Defer G, Dirnagl U, Vivien D (2011) Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* 10:471-480.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11:519-531.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686.
- Markus TM, Tsai SY, Bollnow MR, Farrer RG, O'Brien TE, Kindler-Baumann DR, Rausch M, Rudin M, Wiessner C, Mir AK, Schwab ME, Kartje GL (2005) Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol* 58:950-953.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6:775-786.
- Michel RP, Cruz-Orive LM (1988) Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *J Microsc* 150:117-136.
- Ming GL, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70:687-702.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181-198.
- Moskowitz MA, Grotta JC, Koroshetz WJ, Group SPR, Stroke NINDa (2013) The NINDS Stroke Progress Review Group final analysis and recommendations. *Stroke* 44:2343-2350.

- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- O'Neill LA, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353-364.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD (2006) Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:654-665.
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195.
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (2009) Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387-6392.
- Paton JA, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225:1046-1048.
- Paxinos G, Franklin K (2001) *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California 92101-4495, USA.
- Pelidou SH, Kostulas N, Matusevicius D, Kivisäkk P, Kostulas V, Link H (1999) High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol* 6:437-442.
- Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG (2011) Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation* 8:174.
- Pernhorst K, Herms S, Hoffmann P, Cichon S, Schulz H, Sander T, Schoch S, Becker AJ, Grote A (2013) TLR4, ATF-3 and IL8 inflammation mediator expression correlates with seizure frequency in human epileptic brain tissue. *Seizure* 22:675-678.
- Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE (1979) Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol* 6:371-388.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998)

- Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Popa-Wagner A, Buga AM, Kokaia Z (2011) Perturbed cellular response to brain injury during aging. *Ageing Res Rev* 10:71-79.
- Popa-Wagner A, Badan I, Vintilescu R, Walker L, Kessler C (2006) Premature cellular proliferation following cortical infarct in aged rats. *Rom J Morphol Embryol* 47:215-228.
- Popa-Wagner A, Badan I, Walker L, Groppa S, Patrana N, Kessler C (2007) Accelerated infarct development, cytogenesis and apoptosis following transient cerebral ischemia in aged rats. *Acta Neuropathol* 113:277-293.
- Pradillo JM, Fernández-López D, García-Yébenes I, Sobrado M, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I (2009) Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem* 109:287-294.
- Price CJ, Menon DK, Peters AM, Ballinger JR, Barber RW, Balan KK, Lynch A, Xuereb JH, Fryer T, Guadagno JV, Warburton EA (2004) Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study. *Stroke* 35:1659-1664.
- Préhaud C, Mégret F, Lafage M, Lafon M (2005) Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon. *J Virol* 79:12893-12904.
- Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, Joosten LA, van den Berg WB (2004) Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 50:3856-3865.
- Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H (2011) Programmed death-1 pathway limits central nervous system inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *Stroke* 42:2578-2583.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006) Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:125-134.

- Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9:1081-1088.
- Rueger MA, Muesken S, Walberer M, Jantzen SU, Schnakenburg K, Backes H, Graf R, Neumaier B, Hoehn M, Fink GR, Schroeter M (2012) Effects of minocycline on endogenous neural stem cells after experimental stroke. *Neuroscience* 215:174-183.
- Russo I, Barlati S, Bosetti F (2011) Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. *J Neurochem* 116:947-956.
- Saha B, Jaber M, Gaillard A (2012) Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Front Cell Neurosci* 6:14.
- Sandhir R, Onyszchuk G, Berman NE (2008) Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 213:372-380.
- Scheffel J, Regen T, Van Rossum D, Seifert S, Ribes S, Nau R, Parsa R, Harris RA, Boddeke HW, Chuang HN, Pukrop T, Wessels JT, Jürgens T, Merkler D, Brück W, Schnaars M, Simons M, Kettenmann H, Hanisch UK (2012) Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia* 60:1930-1943.
- Scheffold A, Murphy KM, Höfer T (2007) Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol* 8:1285-1287.
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183:25-33.
- Schultze B, Korr H (1981) Cell kinetic studies of different cell types in the developing and adult brain of the rat and the mouse: a review. *Cell Tissue Kinet* 14:309-325.
- Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA (2011) The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 89:359-372.
- Seshadri S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase CS, Au R, Kannel WB, Wolf PA (2006) The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. *Stroke* 37:345-350.
- Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H (2012a) Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 123 Suppl 2:29-38.

- Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A (2012b) Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 18:911-917.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Slaney CY, Toker A, La Flamme A, Bäckström BT, Harper JL (2011) Naïve blood monocytes suppress T-cell function. A possible mechanism for protection from autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 89:7-13.
- Smith CM, Luskin MB (1998) Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev Dyn* 213:220-227.
- Snappyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A (2009) Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29:4172-4188.
- Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD (2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1477-1497.
- Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK (2011) Toll-like receptor 4 promotes  $\alpha$ -synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. *Am J Pathol* 179:954-963.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002) The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932:110-119.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.
- Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M (2009) Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 40:S8-12.

- Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
- Tang SC, Yeh SJ, Li YI, Wang YC, Baik SH, Santro T, Widiapradja A, Manzanero S, Sobey CG, Jo DG, Arumugam TV, Jeng JS (2013) Evidence for a detrimental role of TLR8 in ischemic stroke. *Exp Neurol* 250:341-347.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13798-13803.
- Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 368:94-99.
- Tarassishin L, Suh HS, Lee SC (2011) Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J Neuroinflammation* 8:187.
- Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA (2003) EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* 111:1125-1132.
- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039.
- Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G (2008) Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 14:3574-3589.
- Urra X, Cervera A, Obach V, Climent N, Planas AM, Chamorro A (2009) Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke* 40:1262-1268.
- Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Karnesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP (2011) LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflammation* 8:140.
- Villeda SA et al. (2011) The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477:90-94.
- Walter J, Keiner S, Witte OW, Redecker C (2010) Differential stroke-induced proliferative response of distinct precursor cell subpopulations in the young and aged dentate gyrus. *Neuroscience* 169:1279-1286.

- Wang YC, Wang PF, Fang H, Chen J, Xiong XY, Yang QW (2013) Toll-like receptor 4 antagonist attenuates intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *Stroke* 44:2545-2552.
- Whitman MC, Fan W, Relat L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA (2009) Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516:94-104.
- Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, Plate KH (2009) VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci* 29:8704-8714.
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD (1998) Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 4:808-813.
- Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1213-1224.
- Yang QW, Lu FL, Zhou Y, Wang L, Zhong Q, Lin S, Xiang J, Li JC, Fang CQ, Wang JZ (2011) HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:593-605.
- Yenari MA, Han HS (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 13:267-278.
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7:378-391.
- Yilmaz G, Granger DN (2008) Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 30:783-793.
- Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN (2006) Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 113:2105-2112.
- Young AR, Ali C, Duretête A, Vivien D (2007) Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J Neurochem* 103:1302-1309.
- Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, Pruim J, Price P (1999) Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group. *Eur J Cancer* 35:1773-1782.
- Yu L, Wang L, Chen S (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* 14:2592-2603.



- Zarruk JG, Fernández-López D, García-Yébenes I, García-Gutiérrez MS, Vivancos J, Nombela F, Torres M, Burguete MC, Manzanares J, Lizasoain I, Moro MA (2012) Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke* 43:211-219.
- Zhang L, Zhang RL, Wang Y, Zhang C, Zhang ZG, Meng H, Chopp M (2005) Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke* 36:847-852.
- Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M (2001) Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105:33-41.
- Zhang RL, Zhang ZG, Lu M, Wang Y, Yang JJ, Chopp M (2006) Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:857-863.
- Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M (2007) Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci* 27:3157-3162.
- Zhou H, Andonegui G, Wong CH, Kubes P (2009) Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol* 183:5244-5250.
- Zhou H, Lapointe BM, Clark SR, Zbytniuk L, Kubes P (2006) A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 177:8103-8110.